



**Etude comparative de récepteurs aux œstrogènes :
Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux
œstrogènes et anti-œstrogènes impliqués dans les causes
et thérapies du cancer du sein.**

Adélaïde Le Grand

► **To cite this version:**

Adélaïde Le Grand. Etude comparative de récepteurs aux œstrogènes : Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux œstrogènes et anti-œstrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bretagne Sud, 2009. Français. NNT : . tel-00470517

HAL Id: tel-00470517

<https://theses.hal.science/tel-00470517>

Submitted on 6 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE / Université de Bretagne-Sud
sous le sceau de L'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE-SUD
Mention : Biologie Santé

École Doctorale SICMA (Santé, Information/Communication,
Mathématiques, Matière)
ED 373

présentée par

Adélaïde Le Grand

Préparée à L'Université de Bretagne-Sud

Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux de Bretagne
Equipe Génie des Bioprocédés-Biomolécules
EA 4250

Soutenue le 18 décembre 2009

devant le jury composé de :

Catherine Royer, Rapporteur
Directrice de Recherche INSERM, Montpellier

Farzad Pakdel, Rapporteur
Directeur de Recherche CNRS, Université de Rennes 1

Saïd Bouhallab, Examinateur
Directeur de Recherche INRA, Agrocampus Rennes

Xavier Le Goff, Examinateur
Chargé de Recherche CNRS, Université de Rennes 1

Véronique Le Tilly, Encadrante
Maître de Conférences, Université de Bretagne-Sud

Odile Mulner-Lorillon, Co-Directrice de Thèse
Directrice de Recherche CNRS, Station Biologique de Roscoff

Olivier Sire, Co-Directeur de Thèse
Professeur, Université de Bretagne-Sud

*Etude comparative de récepteurs
aux œstrogènes :*

*Aspects moléculaire et cellulaire
de la réponse aux œstrogènes et
anti-œstrogènes impliqués
dans les causes et thérapies du
cancer du sein.*

Remerciements

*Comment ne pas commencer par exprimer toute ma reconnaissance à **La Ligue Nationale Contre le Cancer**, plus particulièrement au **Comité départemental du Morbihan** présidé par le **Docteur Bour**, pour m'avoir permise de mener ce travail en m'accordant un financement durant ces trois années. Je tiens également à saluer **Yvonne Le Garrec** ainsi que **Mireille Jolys**.*

Merci à :

***Catherine Royer** et **Farzad Pakdel** pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de cette thèse ; **Saïd Bouhallab** qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et **Xavier Le Goff** pour sa participation à ce jury et pour avoir été membre de mon comité de thèse. Merci pour tes nombreux conseils.*

***Véronique Le Tilly**, je te suis énormément reconnaissante de m'avoir fait confiance de mon premier stage de Master jusqu'à maintenant. Merci de ta persévérance pour la recherche de mon financement de thèse. Que d'émotions !! Je te remercie pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés. Merci d'avoir fait naître en moi ce goût pour la recherche. Je t'en serai éternellement reconnaissante. Merci pour ta très grande disponibilité malgré ton emploi du temps chargé. Je n'oublierai pas tes nombreux conseils, nos moments de discussion à propos des manip (et autres...), nos rendez-vous très matinaux au labo, nos plateaux repas du soir, ... Merci pour ton amitié.*

***Olivier Sire**, je te remercie tout d'abord pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe. Je te serai à jamais reconnaissante de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour ton aide à la rédaction de ce manuscrit, pour ce que tu m'as enseignée, pour ta confiance et ton amitié.*

***Odile Mulner-Lorillon**, je te suis énormément reconnaissante d'avoir participé à l'encadrement de cette thèse. Merci pour ce que tu m'as appris sur la phosphorylation et pour ton aide à la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ta gentillesse et ta grande disponibilité.*

Elizabeth Le Rumeur et **Gilles Salbert** pour avoir suivi mon travail durant ces trois années en participant à mon comité de thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier **Franck Chesnel** pour ses précieux conseils en Western Blot, sa gentillesse et sa disponibilité.

Tous les membres (anciens et actuels) de l'équipe vannetaise Génie des Bioprocédés et Biomolécules du LIMAT B. Je tiens à exprimer tous mes remerciements à **Elodie Lahaye**. J'ai trouvé en toi plus qu'une simple collègue : une véritable amie. Merci pour tes conseils et nos nombreuses discussions. Merci d'avoir été là, de m'avoir écoutée et réconfortée quand le moral était bas. Je tiens également à remercier **Véronique Vellet** pour son professionnalisme, sa joie de vivre, sa franchise et son amitié. Il fût plus qu'agréable de travailler à tes côtés. Un grand merci également à **Jacques Wolff** pour ses conseils scientifiques, à **Philippe Douzenel** pour son aide en chromatographie lors de nos tentatives de purification du récepteur, à **Anthony Bouter** pour son aide lors de mes premiers pas dans le laboratoire, à **Yun Qin**, **Valérie Maxime** et **Nadia Boutaleb** pour leur joie de vivre. Sont associés à ces remerciements, les stagiaires que j'ai côtoyés dans le labo : Camille, Benoît, Cathy, Janic, Sophie. Merci aux membres (anciens et actuels) du laboratoire voisin de Biologie et Chimie Marine : **Alla Silkina**, **Diane Defer**, **Benoît Sérive**, **Kim Doiron**, **Rhimou Bouhlal**. J'associe à ces remerciements **Claudie Evanno**, **Nathalie Bourdet**, **Alexis Lejeune** et **Christel Marty**. Merci aussi aux doctorants que j'ai rencontrés pendant ma thèse : **Camille Traini**, **Caroline Blanche**, **Aline Poirier**, **Nouceiba Adouani**, **Sylvain Chardon**, **Marjorie Dujardin**.

Patrick Cormier et toute l'équipe Traduction, Cycle cellulaire et Développement (**Robert Bellé**, **Julia Morales**, **Sandrine Boulben**, **Bertrand Cosson**, **Virginie Glippa**) pour m'avoir accueillie à la station Biologique de Roscoff lors de mes quelques jours de manips et pour nos discussions échangées lors des séminaires où je vous présentais mes travaux. Merci pour votre gentillesse.

Toute ma famille, qui m'a soutenue durant ces trois années : **Maman**, **Papi** et **Mamie**, mes frères, **Denis** et **Vincent**, ma Belle-sœur **Gwendoline**, mes nièces **Mailis** et **Lou-Ann**, mon oncle et ma tante, **Jean-Lou** et **Cécile**, mon cousin et ma filleule, **Romain** et **Jeanne**. Merci à vous tous ! Je vous aime tant. Je remercie également toute ma future belle-famille et surtout mes futurs beaux-parents.

*Ces trois années de thèse n'auront pas été les mêmes sans des moments de détente avec mes amies rencontrées sur les bancs de l'amphi : **Séverine**, **Anne-Claire** et **Laëtitia**. Merci les filles ! Merci également à **Céline** et **Ronan**.*

*Je ne peux terminer sans remercier celui sans qui je n'aurai certainement pas eu le courage de faire cette thèse : **Régis**. Aucun mot ne sera assez fort pour exprimer à quel point je te suis reconnaissante. Tout d'abord, merci d'avoir mis ta vie professionnelle entre parenthèses le temps de ma thèse afin que nous ne soyons pas séparés et merci d'avoir accepté d'attendre pour être père. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir soutenue pendant mes moments de doutes, de stress, de colère et de joie. Tu es un des principaux piliers et acteurs dans la réussite de cette thèse. Je n'oublierai pas les soirs et les week-ends où tu m'accompagnais au labo, où tu m'aidais à ranger mes dizaines d'erlenmeyers, à annoter mes eppendorf. Merci également pour ton aide pour la relecture de ce manuscrit. Voici une première grande étape de ma vie passée avec toi, en espérant que nous en vivions encore de plus belles... Merci pour tout mon Amour...*

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
SOMMAIRE.....	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	XI
I. Liste des Figures	XIII
II. Liste des Tableaux	XVI
LISTE DES ABREVIATIONS	XIX
INTRODUCTION GENERALE : CANCER ET RECEPTEURS NUCLEAIRES	1
I. Epidémiologie du cancer.....	3
II. Cancérogénèse	4
III. Hormones stéroïdiennes	8
III.1 Définition et Biosynthèse des hormones stéroïdiennes	8
III.2 Effets physiologiques des hormones stéroïdiennes.....	11
III.2.1 Organes cibles et fonctions.....	11
III.2.2 Conséquences de la dérégulation de la synthèse ou de l'action des hormones stéroïdes	12
III.3 Mode d'action <i>via</i> les récepteurs nucléaires.....	13
III.3.1 Classification des récepteurs nucléaires	14
III.3.2 Structure des récepteurs nucléaires	16
IV. Récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes et cancer.....	17
IV.1 Cancer du sein	17
IV.2 Cancer de la prostate.....	19
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : RECEPTEUR AUX ŒSTROGENES.....	21
I. Généralités	23
II. Isotypes du récepteur aux œstrogènes humain : hERα et hERβ	23
II.1 Organisation génomique	24
II.2 Répartition tissulaire et fonctions	25
III. Structure.....	26
III.1 Domaine N-terminal A/B.....	27
III.2 Domaine C : DNA Binding Domain (DBD)	28
III.3 Domaine D : Région charnière.....	30
III.4 Domaine E : Ligand Binding Domain (LBD)	31
III.4.1 Architecture générale	31
III.4.2 Sites de fixation du ligand	32
III.5 Changements conformationnels induits par le ligand	33
III.5.1 Interaction avec les corégulateurs	35
III.5.2 Activation Function-2 (AF-2).....	35
III.5.3 Interface de dimérisation	36
III.6 Domaine F.....	36

IV. Ligands : œstrogènes et anti-œstrogènes.....	36
IV.1 Agonistes	37
IV.2 SERM	38
IV.3 Anti-œstrogènes purs	41
V. Protéines associées	41
V.1 Heat shock proteins : Hsp	42
V.2 p23.....	43
V.3 Immunophilines.....	44
VI. Localisation	44
VI.1 Localisation nucléaire	44
VI.2 Localisation membranaire.....	46
VII. Modification post-traductionnelle : la phosphorylation	48
VII.1 Phosphorylation de hER α	48
VII.2 Phosphorylation de hER β	53
VIII. Mécanismes d'action du récepteur aux œstrogènes.....	54
VIII.1 Action génomique	55
VIII.1.1 Mécanisme de la voie de signalisation génomique classique.....	55
VIII.1.2 Acteurs intervenant dans le mécanisme génomique classique	57
VIII.1.2.1 Eléments de réponse aux œstrogènes (ERE).....	57
VIII.1.2.2 Facteurs généraux de transcription.....	59
VIII.1.2.3 Corégulateurs transcriptionnels	60
VIII.1.3 Mécanisme d'action génomique « ERE-indépendante »	66
VIII.1.4 Mécanisme d'action génomique « ligand-indépendante »	67
VIII.2 Action non génomique de l'œstradiol	68
IX. Fonctionnalités de hERα et hERβ.....	69
X. Récepteur aux œstrogènes de la truite arc-en-ciel : rtER	71
X.1 Isotype alpha du récepteur aux œstrogènes de la truite arc-en-ciel : rtER α	71
X.1.1 Isoforme courte : rtER $_S$	71
X.1.2 Isoforme longue : rtER $_L$	73
X.2 Isoformes rtER α 2, rtER β 1 et rtER β 2	74
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	75
RESULTATS	81
I. Chapitre 1 : Mise en évidence d'un ERE imparfait dans le gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel et recherche de l'effet de synergie d'un tandem de séquences ERE consensus	83
I.1 Introduction à l'article 1 intitulé "Control of vitellogenin genes expression by sequences derived from transposable elements in rainbow trout"	83
I.2 Résultats complémentaires de l'article 1 : Effet de l'insertion d'un second ERE dans le promoteur ...	117
I.3 Discussion du chapitre 1.....	118
II. Chapitre 2 : Stabilité et flexibilité moléculaire de hERα et hERβ	121
II.1 Introduction à l'article 2 intitulé "Estrogen receptors-ligands recognition: stability and flexibility"	121
II.2 Résultats complémentaires de l'article 2 : Liaison aux ligands et environnement moyen des résidus tryptophane au sein de hER α et hER β	161
II.2.1 Comparaison entre les deux isotypes du hER	161
II.2.2 Impact des ligands.....	161
II.3 Discussion du chapitre 2	163

III. Chapitre 3 : Impact des ligands sur les propriétés et la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes.....	165
III.1 Introduction à l'article 3 intitulé "Differential functional properties and sub-cellular localization of human and rainbow trout estrogen receptors in response of estrogens and anti-estrogens".....	165
III.2 Résultats non montrés de l'article 3.....	205
IV. Chapitre 4 : Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire et la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes	209
IV.1 Introduction du chapitre 4.....	209
IV.2 Résultats du chapitre 4.....	212
IV.2.1 Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire de hER α et rtER ς	212
IV.2.2 Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire de GFPhER α et GFPrER ς	213
IV.2.3 Impact de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de GFPhER α et GFPrER ς	216
IV.3 Discussion du chapitre 4	219
DISCUSSION GENERALE.....	223
PERSPECTIVES.....	233
BIBLIOGRAPHIE	237
ANNEXES	267
I. Corégulateurs de ER chez S. cerevisiae.....	269
II. Matériels et Méthodes.....	270
II.1 Matériels	270
II.1.1 Souche de levure.....	270
II.1.2 Vecteurs plasmidiques.....	270
II.1.2.1 Vecteurs d'expression	270
II.1.2.2 Vecteurs rapporteurs	271
II.1.3 Solutions.....	272
II.1.3.1 Etude in vivo.....	272
II.1.3.2 Etude in vitro	274
II.2 Méthodes.....	276
II.2.1 Etude in vivo.....	276
II.2.1.1 Transformation de S. cerevisiae par un vecteur d'expression et un vecteur rapporteur.....	276
II.2.1.2 Dosage de trans-activation du récepteur aux œstrogènes	276
II.2.1.3 Analyse protéique	278
II.2.1.4 Microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence	280
II.2.2 Etude in vitro : Spectroscopie de fluorescence	281
II.2.2.1 Généralités.....	281
II.2.2.2 Sondes fluorescentes	283
II.2.2.3 Atténuation de fluorescence	287
II.2.2.4 Temps de vie de fluorescence	288
II.2.2.5 Anisotropie de fluorescence	289
II.2.2.6 Stabilité thermique.....	290

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

I. Liste des Figures

Figure 1 : Comparaison du nombre de nouveaux cas de cancer (incidence) et de décès (mortalité) en 2002, entre les pays développés et ceux en voie de développement, sexes confondus.....	4
Figure 2 : Schéma général de la réponse de la cellule à l'endommagement de l'ADN.	6
Figure 3 : Structure du cholestérol.	8
Figure 4: Schéma général de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol (ou stéroïdogénèse).....	9
Figure 5 : Principales voies de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.....	11
Figure 6 : Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires.	15
Figure 7 : Classification des récepteurs nucléaires selon leurs propriétés fonctionnelles (Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1995).	16
Figure 8 : Organisation structurale et fonctionnelle des isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes humain.	26
Figure 9 : Structure tridimensionnelle de l'homodimère du DBD du hER α fixé sur une séquence consensus de l'Element de Réponse aux Œstrogènes (ERE _{cs}).	29
Figure 10 : Séquence en acides aminés des deux motifs en doigt de zinc CI et CII du DBD de hER α	29
Figure 11 : Signaux de localisation nucléaire (NLS) des récepteurs aux œstrogènes.....	31
Figure 12 : Structure canonique du monomère LBD de l'isotype α humain du récepteur aux œstrogènes complexé au 17 β -œstradiol.....	32
Figure 13 : Modifications conformationnelles du LBD de hRXR α induites par la liaison à un ligand (Egea <i>et al.</i> , 2000; Gangloff, 2000).	34
Figure 14 : Modifications conformationnelles du LBD de hER α induites par la liaison à un ligand agoniste ou antagoniste.	34
Figure 15 : Pharmacologie tripartite du récepteur aux œstrogènes adaptée de Katzenellenbogen et Katzenellenbogen (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000).	37
Figure 16 : Etapes de "chaperonnage" du récepteur aux œstrogènes.	43
Figure 17 : Localisation et nature des sites de phosphorylation identifiés au sein de la structure primaire du hER α	48
Figure 18 : Alignement des séquences en résidus aminoacides des deux isotypes des récepteurs aux œstrogènes humains.	53

Figure 19 : Les différentes voies de signalisation cellulaire de l'œstradiol et de son récepteur.	54
Figure 20 : Modèle classique d'action du récepteur aux œstrogènes.	55
Figure 21 : Séquence ERE consensus et position des bases nucléotidiques.	58
Figure 22 : Schéma simplifié du recrutement des corégulateurs par le récepteur aux œstrogènes et initiation de la transcription.	60
Figure 23 : Représentation schématique de la famille des coactivateurs SRC/p160.	63
Figure 24 : Organisation structurale de CBP/p300 et des interactions avec les différents coactivateurs et facteurs de transcription.	65
Figure 25 : Organisation structurale et fonctionnelle du hER α et du rtER ς	72
Figure 26 : Courbes Dose-réponse réalisées sur des levures transformées par le vecteur rapporteur contenant une ou deux séquences ERE _{cs}	117
Figure 27 : Comparaisons des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des résidus W au sein de hER α et hER β	161
Figure 28 : Normalisation des spectres d'émission de fluorescence des W au sein de hER α (A,B) et hER β (C, D) seuls ou liés aux œstrogènes (A et C) ou ou anti-œstrogènes (B, D). ..	162
Figure 29 : Alignement des séquences en résidus aminoacides de hER α et rtER ς	210
Figure 30 : Activités cellulaires de hER α et rtER ς mesurées en présence ou non d'inhibiteurs de kinases et d'œstradiol.	212
Figure 31 : Comparaison des activités cellulaires de hER α et rtER ς fusionnés ou non à la GFP.	214
Figure 32 : Analyse protéique en Western Blot des extraits issus de culture de <i>S. cerevisiae</i> exprimant GFP α (A) ou GFP ς (B) en fonction de la présence ou non d'œstradiol et d'inhibiteur de kinases.	215
Figure 33 : Vecteurs d'expression pY60 et vecteur rapporteur YRPE2.	271
Figure 34 : Organisation de la région intergénique séparant les gènes codant pour la vitellogénine de la truite arc-en-ciel.	272
Figure 35 : Principe de la mesure de <i>trans</i> -activation du gène <i>lacZ</i> par le ER chez <i>S. cerevisiae</i>	277
Figure 36 : Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage laser (CSLM). ..	280
Figure 37 : Diagramme de Jablonski (Jablonski, 1935).	282
Figure 38 : Structure chimique et caractéristiques spectrales du tryptophane.	283

Figure 39 : Localisation des résidus tryptophane au sein de deux isotypes humains du récepteur aux œstrogènes.....	285
Figure 40 : Structure chimique et caractéristiques spectrales de la fluorescéine isothiocyanate (FITC).....	286
Figure 41 : Schéma du principe de mesure de l'anisotropie de fluorescence.	289

II. Liste des Tableaux

Tableau 1 : Quelques gènes impliqués dans les cancers humains (Weinberg, 1996).	7
Tableau 2 : Hormones stéroïdiennes et lieu de synthèse.	10
Tableau 3 : Pathologies engendrées par un excès ou un défaut de synthèse ou d'action des hormones stéroïdiennes.	13
Tableau 4 : Rôle des différents récepteurs nucléaires dans le cancer du sein (Conzen, 2008).	19
Tableau 5 : Structures des trois catégories de ligands du récepteur aux œstrogènes humain.	40
Tableau 6 : Affinité de certains ligands vis-à-vis des deux isotypes α et β du hER (Zhu <i>et al.</i> , 2008).	40
Tableau 7 : Sites de phosphorylation, kinases potentielles et rôle de la phosphorylation dans la fonction de hER α	50
Tableau 8 : Gènes régulés par les récepteurs aux œstrogènes et leur séquence ERE (liste non exhaustive).	57
Tableau 9 : Corégulateurs du récepteur aux œstrogènes (liste non exhaustive) (Klinge, 2000; Hall et McDonnell, 2005).	61
Tableau 10 : Comparaison des valeurs des EC ₅₀ et des facteurs de stimulation hormonale obtenus en présence d'un ou deux EREcs.	118
Tableau 11 : Localisation subcellulaire de GFP α , GFP β et GFP en fonction des ligands : en absence, en présence d'agoniste (E2 ou DES) ou d'antagoniste (4-OHT, Ral ou ICI).	206
Tableau 12 : Localisation subcellulaire de GFP α , GFP β et GFP en présence de E2 et d'antagonistes (4-OHT, Ral, ICI).	207
Tableau 13 : Localisation subcellulaire de GFP α , GFP β fusionnés à la GFP en présence de DES et d'antagonistes.	208
Tableau 14 : Absence d'autofluorescence des levures sauvages (souches W303.1B) et de cellules exprimant l'aquaporine.	208
Tableau 15 : Structure et IC ₅₀ des inhibiteurs des kinases utilisés.	211
Tableau 16 : Localisation subcellulaire de GFP α (A) ou GFP β (B) exprimés chez <i>S. cerevisiae</i> en fonction de la présence ou non d'œstradiol et/ou d'inhibiteur de kinases.	217
Tableau 17 : Liste des corégulateurs interagissant avec le récepteur aux œstrogènes chez <i>S. cerevisiae</i> et leurs analogues chez l'homme.	269
Tableau 18 : Solutions salines et milieux de culture.	273

Tableau 19 : Oligonucléotides fluorescéinés utilisés pour les mesures d'anisotropie de fluorescence.	275
Tableau 20 : Paramètres spectraux des résidus W situés dans des environnements protéiques distincts : classification de Burstein (Burstein <i>et al.</i> , 1973).	285

LISTE DES ABREVIATIONS

4-OHT	4-hydroxytamoxifène
αERKO, βERKO	organisme invalidé pour l'isotype α ou β du ER
ADN, ADNc	Acide DésoxyriboNucléique, ADN complémentaire
AF-1, AF-2	<i>Activation Function-1 or 2</i>
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARN, ARNm	Acide Ribonucléique, ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CoNR	<i>CoRepressor Nuclear Receptor</i>
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding protein</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DES	Diéthylstilbestrol
DO	Densité Optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	<i>Dithio-threitol</i>
E1	Œstrone
E2	17β-œstradiol
E3	Œstriol
EC₅₀	<i>Half maximal Effective Concentration</i> : concentration nécessaire pour observer 50% de la réponse maximale
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
ERE_{cs}, rvtgERE	ERE consensus, ERE retrouvé dans la région promotrice du gène <i>vgt</i> de la truite arc-en-ciel
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
ESR1, ESR2	gènes codant pour hERα et hERβ chez l'homme
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GnRH	<i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
HAT	Histone Acétyl-Transférase
HDAC	<i>Histone deacetylcomplex</i>
hERα, hERβ	<i>human estrogen receptor</i> , isotype α ou β
Hip	<i>Hsp70 interacting protein</i>
Hop	<i>Hsp70-Hsp90 organizing protein</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IC₅₀	<i>Half maximal Inhibitory Concentration</i> : Concentration nécessaire pour observer une diminution de 50% de l'activité maximale
ICI	ICI 182780
IGF, EGF	<i>Insulin-like ou Epidermal Growth factor</i>

kb	kilobase
K_D	Constante d'équilibre de dissociation
kDa	kilo Dalton
lacZ	gène codant pour la β-galactosidase
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LCoR	<i>Ligand-dependent CoRepressor</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NCoA, NCoR	<i>Nuclear receptor CoActivator, Nuclear receptor CoRepressor</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NR	<i>Nuclear Receptor</i>
ONP, ONPG	o-Nitrophénol, o-Nitrophényl-β-D-galactopyranoside
P	Progestérone
PI3K	PhosphoInositol-3 Kinase
PKA	Protéine kinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPIase	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomérase
PR	<i>Progesteron Receptor</i>
Ral	Raloxifène
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
rtER_S, rtER_L	<i>rainbow trout Estrogen Receptor, isoform short or length</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
T	Testostérone
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TF	<i>Transcription Factor</i>
tpm	Tour par minute
TR	<i>Thyroid Receptor</i>
TRE	<i>Thyroid Response Element</i>
u.M.	Unité Miller
VTG, rtVTG	Vitellogénine, vitellogénine de la truite arc-en-ciel
YPD	Yeast Peptone Dextrose
YPRE	Yeast Peptone Raffinose Ethanol

INTRODUCTION GENERALE :

CANCER ET RECEPTEURS NUCLEAIRES

I. Épidémiologie du cancer

Le cancer existe depuis toujours et touche aussi bien les animaux que les plantes. Cette maladie est qualifiée à tort de récente, étant donné que son diagnostic est resté longtemps méconnu et que l'espérance de vie des personnes était trop courte pour développer un cancer. Environ 11 millions de personnes apprennent qu'elles sont atteintes d'un cancer chaque année dans le monde. Les données les plus récentes sur la mortalité et la prévalence font état de 7 millions de morts et de 25 millions de personnes vivant avec un cancer en 2002 (Parkin *et al.*, 2005). Ces données ont été publiées dans un rapport rédigé par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer ou *IARC, International Agency for Research on Cancer*) portant le nom de Globocan 2002. Ce rapport met en évidence les variations de l'incidence de 26 types de cancer en 2002, en fonction de la localisation géographique, du sexe et de l'âge des individus. Tous les pays et toutes les populations du monde sont touchés par le cancer avec des différences géographiques importantes. Les pays riches présentent le plus fort taux de cancer. Les cancers les plus fréquents (Figure 1) (tumeurs du poumon, du côlon-rectum, du sein, de la prostate, ...) résultent notamment du tabagisme, du mode de vie occidental (comme l'alimentation, l'obésité, l'alcoolisme) et de la pollution (pesticides, amiante, benzène, radiations, ...). Dans les pays en développement, jusqu'à 25% des tumeurs sont associées à des infections chroniques dues, par exemple, au virus de l'hépatite B (cancer du foie), au virus du papillome humain (cancer du col de l'utérus) et à *Helicobacter pylori* (cancer de l'estomac). En France, le cancer représente la première cause de mortalité depuis le début des années 1990, avec environ 320 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2005 et environ 145 000 décès (chiffres publiés par le réseau FRANCIM, FRANce-Cancer-Incidence et Mortalité). Le cancer du poumon est le plus fréquent et la première cause de décès par cancer, avec un taux de mortalité avoisinant les 15%. Le cancer du sein représente environ 25% des cancers dans le monde, les deux sexes confondus. Il est classé en seconde position, derrière le cancer du poumon, mais est le plus répandu chez la femme. Son incidence est très élevée dans les pays riches, en raison de l'existence de programmes nationaux de dépistage. A l'inverse, son taux de mortalité est faible, grâce à la précocité du diagnostic et aux innovations thérapeutiques.

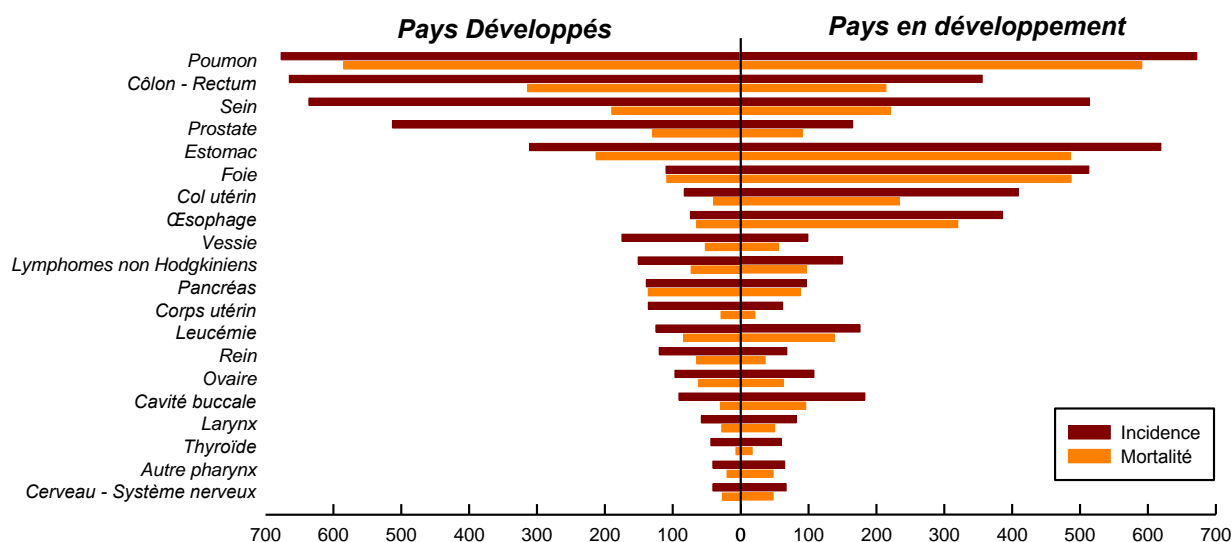


Figure 1 : Comparaison du nombre de nouveaux cas de cancer (incidence) et de décès (mortalité) en 2002, entre les pays développés et ceux en voie de développement, sexes confondus.

Les données ont été répertoriées selon le type de cancer par le CIRC en 2002 et publiées dans le rapport Globocan 2002.

II. Cancérogénèse

Le cancer est un terme générique, utilisé pour décrire une pathologie caractérisée par la présence d'une ou plusieurs tumeur(s) maligne(s), résultant d'un dérèglement de la prolifération cellulaire et de la suppression de la mort cellulaire programmée. Le cancer pouvant survenir dans tous les tissus, il en existe un très grand nombre. Les tumeurs qui se forment à partir de cellules des tissus conjonctifs, des os ou des muscles sont des sarcomes. Celles qui prennent naissance dans un tissu épithélial, comme la peau, sont des carcinomes.

Il est connu que le cancer est dû à un endommagement génétique, causé par des agents chimiques (= carcinogènes), des radiations ionisantes (rayons α , β , γ et X) et non ionisantes (ex : UV-B), des virus (ex : *papillomavirus*) ou des molécules issues du métabolisme même de la cellule. Le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse, processus appelé transformation, correspond à l'acquisition de propriétés caractéristiques : prolifération incontrôlée, indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération et insensibilité aux signaux inhibiteurs, abolition de l'apoptose, acquisition d'un pouvoir invasif, capacité à l'angiogénèse, instabilité génomique, etc.

Le résultat final de la division cellulaire, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, est la production de deux cellules filles possédant la même information génétique que la cellule d'origine (la cellule mère). Le processus de division des cellules eucaryotes suit un cycle composé de cinq phases : S (réplication du génome), M (mitose), deux phases Gap, G_1 précédant la phase S et G_2 préparant la phase M et C (cytocinèse). Le cycle cellulaire est soigneusement contrôlé par 3 points de contrôle (ou *checkpoints*). Ces points de contrôle existent à la fois pour apprécier l'état interne de la cellule et intégrer les signaux externes pouvant influencer le déroulement du cycle. Il en existe trois : G_1/S , G_2/M et le point de contrôle fusorial. Le passage par ces points de contrôle est soumis à des protéines kinases, enzymes possédant une sous-unité catalytique, la CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*), et une sous-unité régulatrice, la cycline. La décision prise au point G_1/S dépend essentiellement de l'intégrité du génome alors que le point G_2/M juge le succès de la réplication de l'ADN et le dernier, le point de contrôle fusorial, assure une bonne disposition des chromosomes sur la plaque mitotique en vue de l'anaphase.

La détection d'un ADN endommagé ou mal répliqué au point de contrôle G_1/S provoque un ralentissement voire un arrêt du cycle cellulaire et active la machinerie de réparation de l'ADN (Figure 2). Lorsque la réparation est effective, l'inhibition du cycle cellulaire est levée. Dans le cas contraire, si les dommages de l'ADN sont en trop grand nombre ou la machinerie de réparation de l'ADN est défaillante, la mort cellulaire est programmée (= apoptose, Figure 2). Certaines cellules subissent des dommages au niveau des gènes codant pour des facteurs indispensables dans les voies de signalisation des points de contrôle et échappent ainsi à la « surveillance ». Il y a deux grandes catégories de gènes associés au cancer (Tableau 1) : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes, dont la forme normale non mutée est appelée proto-oncogène, codent généralement des protéines nécessaires à la cellule pour interpréter les signaux externes de croissance. Les mutations des proto-oncogènes accélèrent le cycle cellulaire en amplifiant ces signaux. Les gènes suppresseurs de tumeurs, quant à eux, codent pour des protéines qui inhibent la division cellulaire. La modification de ces gènes engendre une disparition des contrôles du cycle cellulaire et une prolifération cellulaire incontrôlée. Ces cellules, instables génétiquement, peuvent accumuler d'autres mutations (4-6) et acquérir la possibilité d'échapper à l'apoptose (Figure 2). Ce phénomène se produit généralement sur une très longue plage chronologique, pouvant aller jusqu'à 40 ans. La troisième phase du développement d'un cancer est la progression tumorale. Durant cette étape, la tumeur acquiert un caractère malin. Un apport en énergie devient indispensable pour que la tumeur continue

de s'accroître. Elle élabore donc un stratagème très efficace en sécrétant des signaux chimiques, tel que VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*), afin de détourner les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins voisins. La finalité de ce processus, appelé angiogénèse, est la formation d'un réseau de capillaires au sein de la tumeur (Folkman, 1971). Cette dernière possède alors la capacité d'envahir d'autres organes ou tissus et donc de former des métastases.

Depuis quelques années, le concept de l'origine du cancer au niveau des cellules souches émerge. Les agents carcinogènes ou les molécules issues du métabolisme cellulaire peuvent générer des lésions de l'ADN ou des problèmes de division de la cellule. Les cellules souches « pré-cancéreuses » deviennent alors génétiquement instables. Par évolution clonale, ces cellules deviennent des « cellules cancéreuses » qui forment des tumeurs et en assurent le renouvellement.

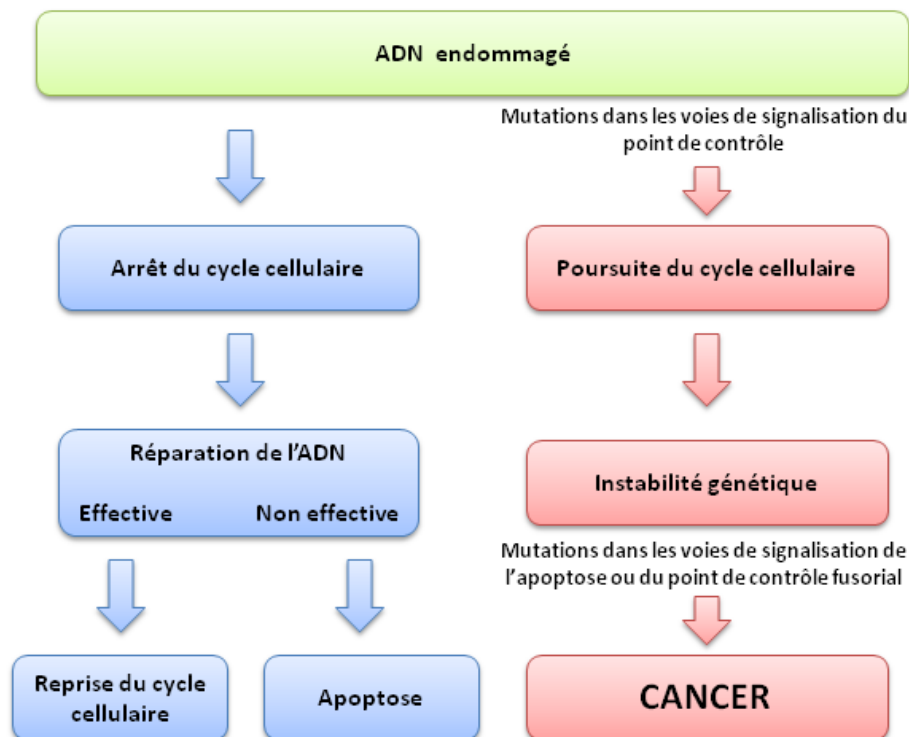


Figure 2 : Schéma général de la réponse de la cellule à l'endommagement de l'ADN.

Au point de contrôle G₁/S, l'ADN endommagé est détecté et le cycle cellulaire est bloqué. Le système de réparation de l'ADN est alors activé. Lorsque la réparation de l'ADN est effectuée, le cycle cellulaire peut reprendre. Si les dommages sont trop importants ou si la machinerie de réparation de l'ADN est défaillante, la mort cellulaire est programmée. Les cellules ayant subi des dommages dans les voies de signalisation des points de contrôle ne détectent pas la lésion de l'ADN. Les cellules deviennent instables génétiquement. L'accumulation d'autres dommages, notamment au niveau du contrôle de l'apoptose, mène au cancer (d'après (Bellé *et al.*, 2007)). L'induction de la plupart des cancers implique la mutation de plusieurs gènes (4 à 6 en général).

Tableau 1 : Quelques gènes impliqués dans les cancers humains (Weinberg, 1996).

Gène	Produit	Cancer
ONCOGENES		
Gènes codant des facteurs de croissance ou leurs récepteurs		
<i>erb-B</i>	Récepteur du facteur de croissance épidermique	Glioblastome (cancer du cerveau), cancer du sein
<i>erb-B2</i>	Récepteur d'un facteur de croissance (équivalent à <i>HER-2</i> ou <i>neu</i>)	Cancer du sein, cancer des ovaires, cancer des glandes salivaires
<i>PDGF</i>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	Gliome (cancer du cerveau)
<i>RET</i>	Récepteur de facteur de croissance	Cancer thyroïdien
Gènes codant des relais cytoplasmiques dans les voies de transmission intracellulaire		
<i>R-ras</i>	Protéine kinase, <i>signalling</i> des facteurs de croissance	Cancer du poumon, cancer du côlon, cancer des ovaires, cancer pancréatique
<i>N-ras</i>	Protéine kinase	Leucémies
Gènes codant des facteurs de transcription qui activent la transcription de gènes favorisant la croissance		
<i>c-myc</i>	Facteur de transcription	Cancer du poumon, cancer du sein, cancer de l'estomac, leucémies
<i>L-myc</i>	Facteur de transcription	Cancer du poumon
<i>N-myc</i>	Facteur de transcription	Neuroblastome (cancer des cellules nerveuses)
Gènes codant d'autres types de protéines		
<i>bcl-2</i>	Protéine bloquant le suicide cellulaire	Lymphome des cellules folliculaires B
<i>bcl-1</i>	Cycline D1 stimulant l'horloge du cycle cellulaire (équivalent à <i>PRAD1</i>)	Cancer du sein
<i>MDM2</i>	Protéine antagoniste de suppresseur de tumeur p53	Sarcomes très divers (cancers des tissus conjonctifs)
GENES SUPPRESSEURS DE TUMEURS		
Gènes codant des protéines cytoplasmiques		
<i>APC</i>	Etape d'une voie de transmission	Cancer du côlon, cancer de l'estomac
<i>DPC4</i>	Relais de la voie de transmission qui inhibe la division cellulaire	Cancer pancréatique
<i>NF-1</i>	Inhibiteur de Ras, protéine stimulant la division cellulaire	Neurofibrome, leucémie myéloïde
<i>NF-2</i>	Inhibiteur de Ras	Méningiome (cancer du cerveau), schwannome (cancer des cellules supportant les nerfs périphériques)
Gènes codant des protéines nucléaires		
<i>p53</i>	Protéine p53 stoppant la division cellulaire au point de contrôle G1	Large gamme de cancers
<i>Rb</i>	Protéine Rb fonctionnant comme frein principal du cycle cellulaire	Rétinoblastome, cancer du sein, cancer des os, cancer de la vessie
<i>ATM / ATR</i>	Protéines kinases détectant les lésions de l'ADN	Cancer du côlon
<i>Sarc</i>	Protéine SARC	Sarcome des tissus mous
<i>Abl</i>	Tyrosine kinase Abl stimulant l'apoptose	Leucémie
Gènes codant d'autres protéines		
<i>BRCA-1</i>	Une partie d'une ubiquitine-ligase (E_3)	Cancer du sein, cancer des ovaires
<i>BRCA-2</i>	Protéine de liaison à l'ADN participant à la réparation des cassures double brins	Cancer du sein
<i>VHL</i>	Régulation de la transcription et l'expression de VEGF	Cancer des cellules rénales

III. Hormones stéroïdiennes

Les hormones constituent un système de communication élaboré permettant aux cellules de notre corps d'être en permanence renseignées sur leur environnement et d'y adapter leur fonctionnement.

Deux catégories d'hormones sont présentes dans les cellules. Tout d'abord, il existe des hormones hydrophiles, incapables de traverser la membrane plasmique des cellules. Elles agissent alors *via* des récepteurs membranaires et déclenchent une cascade de seconds messagers (AMPc, GMPc, calcium et/ou phosphoinositides, diacylglycérol).

La deuxième catégorie est celle des hormones lipophiles. Ce sont principalement les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes, les métabolites des vitamines A et D, ainsi que l'ecdysone. Ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, puis se fixer au niveau de récepteurs spécifiques : les récepteurs nucléaires.

La suite du manuscrit se focalisera essentiellement sur les hormones stéroïdiennes et plus particulièrement sur leurs récepteurs nucléaires.

III.1 Définition et Biosynthèse des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes se définissent comme des molécules possédant une structure de type perhydrocyclopentaphénantrénique communément appelée noyau stérane composé de quatre cycles (notés de A à D) (Figure 3).

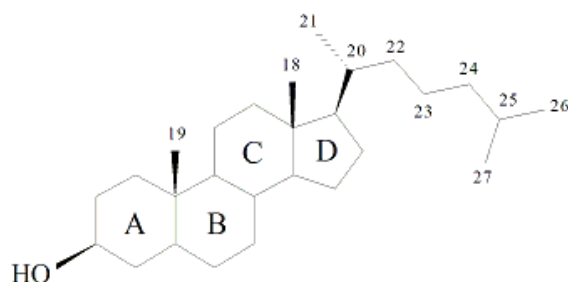


Figure 3 : Structure du cholestérol.

Le cycle perhydrocyclopentaphénantrénique ou cycle stérane est composé de 4 cycles aromatiques notés de A à D. Ce cycle est commun à tous les stérols et stéroïdes.

Chez les mammifères, le cholestérol (Figure 3) est le stérol précurseur de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux sexuels (progestérone, androgènes et œstrogènes), des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes (Figure 4) et aussi des acides et sels biliaires et en partie des vitamines D.

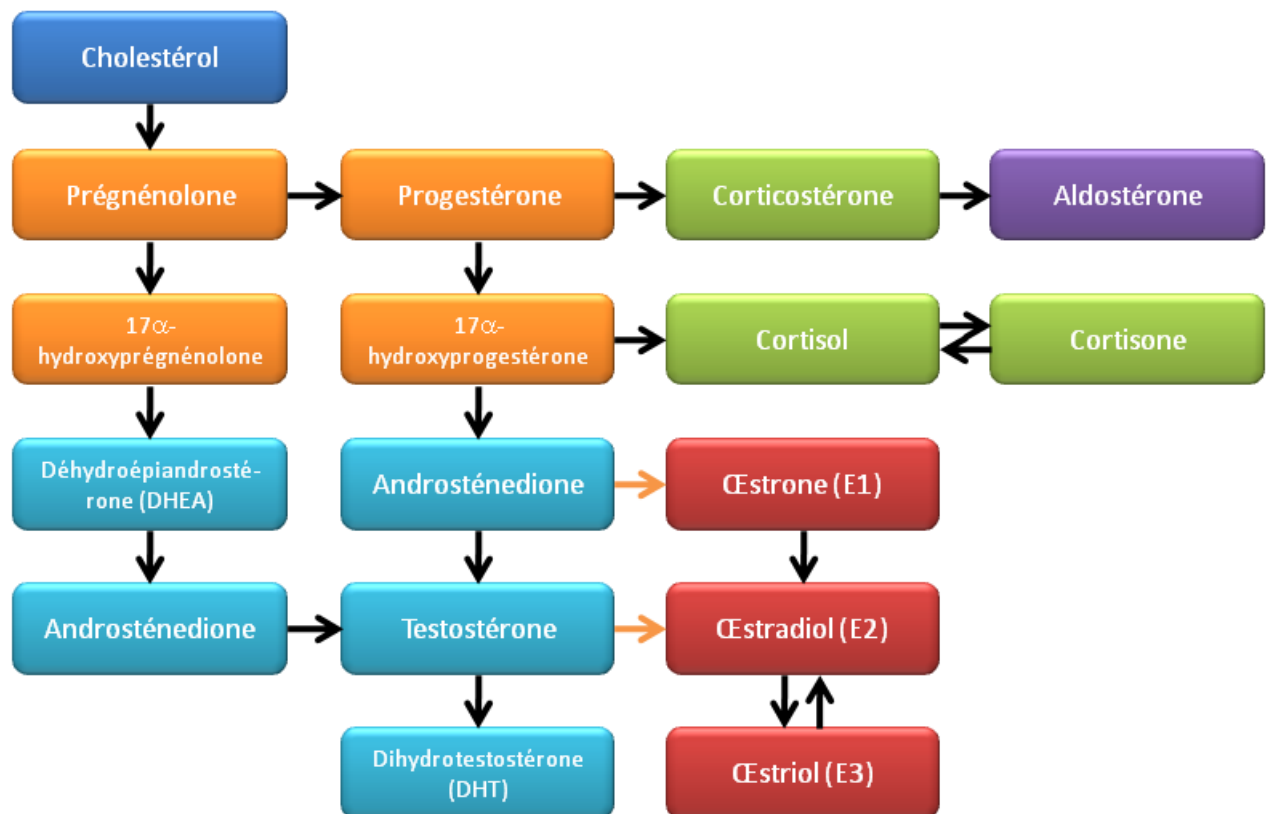


Figure 4: Schéma général de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol (ou stéroïdogénèse).

Les rectangles oranges indiquent les hormones appartenant à la famille des progestagènes, les verts, celle des glucocorticoïdes, la violette, celle des minéralocorticoïdes, les bleus, celle des androgènes et les rouges, celle des œstrogènes. Les flèches oranges correspondent aux réactions catalysées par une aromatasase.

Les lieux de synthèse des hormones stéroïdiennes sont variés chez les mammifères (Tableau 2). Ainsi pour les stéroïdes hormonaux, le cholestérol est transformé en cortisol, aldostérone et androgènes dans les glandes corticosurrénales ; en progestérone et œstradiol dans les ovaires ; en testostérone dans les testicules.

Tableau 2 : Hormones stéroïdiennes et lieu de synthèse.

Hormones stéroïdiennes	« Glandes » endocrines
Minéralocorticoïdes	Corticosurrénales
Glucocorticoïdes	Corticosurrénales
Androgènes	Corticosurrénales, androgènes
Progestérone	Ovaires
Œstrogènes	Ovaires, testicules
Testostérone	Testicules

La régulation de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux suit un axe physiologique appelé « axe hypothalamo-hypophyso-gonadique » (Figure 5). L'hypothalamus sécrète par impulsions (toutes les 60 à 90 minutes) une hormone : la gonadolibérine ou GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*). Elle est véhiculée jusqu'à l'hypophyse où elle stimule la sécrétion de deux hormones gonadotrophiques : la FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) et la LH (*Luteinizing Hormone*). Celles-ci activent la gamétogénèse et la sécrétion des hormones stéroïdiennes (Œstradiol, E2, Progestérone, P et Testostérone, T). Les hormones stéroïdiennes agissent au niveau hypophysaire en régulant l'expression des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes (ER, *Estrogen Receptor*), à la progestérone (PR, *Progesterone Receptor*) et à la GnRH (GnRH-R) et au niveau hypothalamique en modifiant l'amplitude et la fréquence de libération de la GnRH.

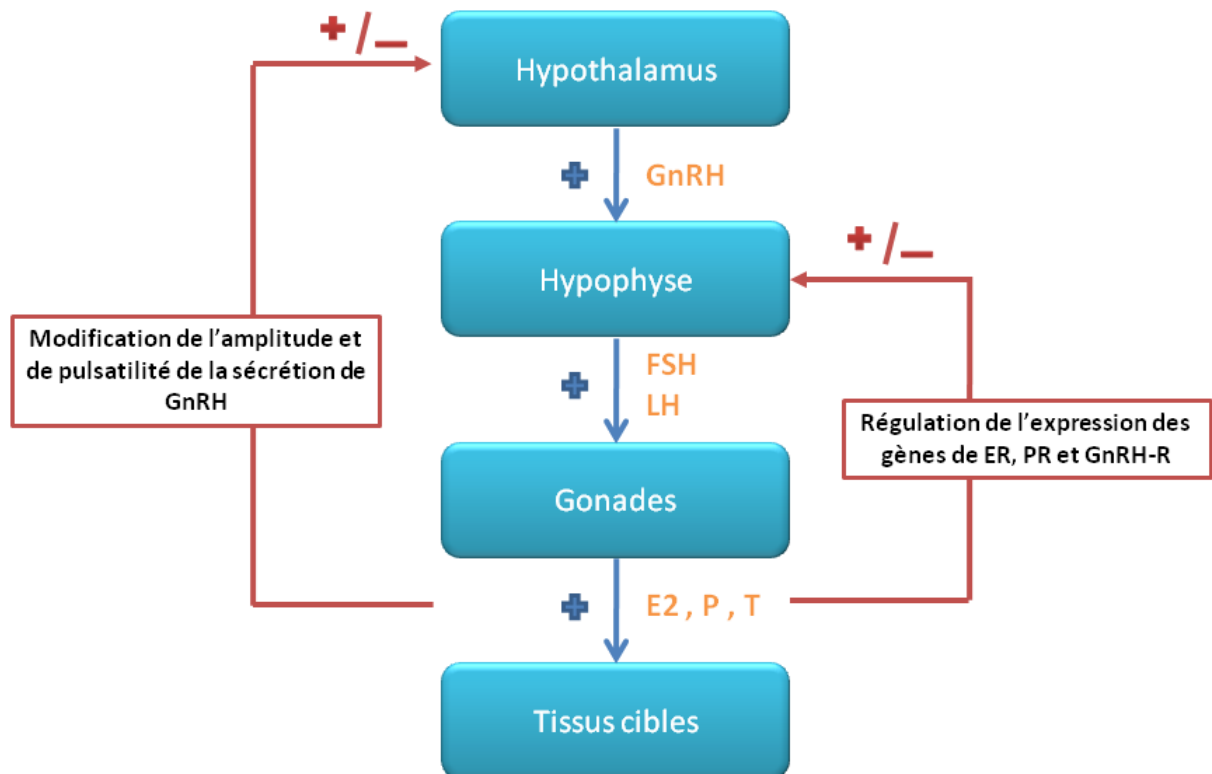


Figure 5 : Principales voies de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Les flèches bleues (avec +) correspondent à un rétrocontrôle positif alors que les flèches rouges (avec +/-) indiquent que les hormones stéroïdiennes sont capables d'exercer un rétrocontrôle positif ou négatif sur la sécrétion des hormones hypothalamo-hypophysaires. Les hormones sécrétées par les différents organes de cet axe sont notées en orange.

III.2 Effets physiologiques des hormones stéroïdiennes

III.2.1 Organes cibles et fonctions

Les organes cibles des hormones stéroïdiennes sont extrêmement variés. Les hormones sexuelles (E2, P et T) participent à la fonction de reproduction. On les retrouve en grande quantité dans les glandes mammaires, les ovaires, le vagin et l'utérus chez les mammifères ou le foie et l'oviducte chez les organismes ovipares. Les principaux effets des œstrogènes sont le développement et le maintien des organes sexuels féminins, l'induction de la ponte ovulaire, l'augmentation du taux de cholestérol HDL, une stimulation de l'activité ostéoblastique (responsable de la formation osseuse) et la stimulation de la synthèse de certains facteurs de la coagulation. Les hormones stéroïdes progestatives favorisent la nidation de l'œuf fécondé, maintiennent la grossesse et possèdent une action anti-ovulatoire.

par inhibition de la sécrétion de LH-FSH. Les androgènes interviennent dans la différenciation du phénotype masculin durant le développement embryonnaire. Ils ont également un rôle dans le développement des caractères sexuels secondaires à la puberté, dans le maintien des caractéristiques masculines et une action anabolisante sur les muscles et les os. Les glucocorticoïdes sont essentiellement retrouvés dans le foie et le tissu adipeux, au niveau desquels ils régulent la redistribution des graisses et stimulent la glycogénogénèse (synthèse de glycogène), la néoglucogénèse (synthèse de glucose) et le catabolisme protéique. Ils possèdent également un effet anti-inflammatoire, antiallergique et immunosuppresseur. Les effets des minéralocorticoïdes sont essentiellement rénaux : ils favorisent la rétention de sodium et augmentent l'élimination de potassium.

On trouve également les stéroïdes au niveau de la peau (les œstrogènes stimulent l'activité des fibroblastes dermiques, la teneur en eau et en acide hyaluronique et le taux de collagène du derme), des os (œstrogènes et progestérone) et de la prostate (androgènes).

III.2.2 Conséquences de la dérégulation de la synthèse ou de l'action des hormones stéroïdes

Les grandes fonctions biologiques de l'organisme sont sous le contrôle d'hormones et un dérèglement dans la synthèse ou le fonctionnement de l'une d'entre elles peut avoir de lourdes conséquences pour l'organisme. Le Tableau 3 (liste non exhaustive) énumère les pathologies engendrées par un dérèglement des hormones stéroïdiennes. On y remarque que dans la plupart des cas, une surproduction et/ou une suractivité des hormones sont la cause de cancer. Les récepteurs nucléaires, médiateurs intracellulaires de l'action des hormones, constituent donc d'importantes cibles pharmacologiques et la compréhension de leur mode d'action suscite un grand intérêt.

Tableau 3 : Pathologies engendrées par un excès ou un défaut de synthèse ou d'action des hormones stéroïdiennes.

Hormones	Excès de synthèse ou d'action	Défaut de synthèse ou d'action
Androgènes	Puberté précoce chez le garçon Virilisation / ambiguïté génitale chez le fœtus féminin Cancer de la prostate chez l'homme adulte Hirsutisme, Syndrome des ovaires polykystiques, tumeurs ovariennes et surrénaliennes chez la femme adulte	Défaut de virilisation / ambiguïté génitale chez le fœtus Diminution du volume testiculaire et du taux de testostérone, stérilité chez l'homme adulte Non synthèse d'œstrogènes, retard pubertaire ou impuberisme chez la femme adulte
Minéralocorticoïdes	Hyperaldostéronisme (Syndrome de Conn) : hypertension, accès de pseudo paralysie, urines fréquentes et abondantes et soif intense	Perte de sel et déshydratation
Glucocorticoïdes	Hypercorticisme (Syndrome de Cushing): hypertension artérielle, vergetures pourpres, ostéoporose, amyotrophie	Augmentation de la synthèse d'androgènes Augmentation des minéralocorticoïdes
Œstrogènes	Troubles de l'embryogénèse Fibromes utérins Cancer de l'endomètre Cancer du sein Cancer des ovaires	Troubles du développement des organes sexuels et des caractères sexuels secondaires Aménorrhée, ménopause précoce Ostéoporose, dermatose Maladie cardio-vasculaire (athérosclérose) Troubles neurologiques (maladie d'Alzheimer)
Progestérone	Cancer du sein Œdèmes	Troubles du développement des organes sexuels et des caractères sexuels secondaires Aménorrhée Ménopause précoce Stérilité Cancer de l'endomètre

III.3 Mode d'action *via* les récepteurs nucléaires

Après liaison de l'hormone, les récepteurs nucléaires (NR, *Nuclear Receptor*) sont capables de se fixer, généralement sous forme dimérique, à une séquence d'ADN spécifique appelée élément de réponse aux hormones (HRE, *Hormone Response Element*) et présente en amont du promoteur du gène cible. Cette fixation entraîne un recrutement de cofacteurs et de la machinerie transcriptionnelle et, par conséquent, l'expression du gène cible.

III.3.1 Classification des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires constituent une superfamille de facteurs de transcription. Les techniques récentes de clonage et de séquençage ont permis de mettre en évidence plus de 300 récepteurs nucléaires, faisant de cette famille la plus grande classe de facteurs de transcription connue chez les eucaryotes. Pour certains récepteurs nucléaires, aucun ligand n'est connu. Ils sont appelés récepteurs orphelins. L'analyse des homologies de séquences des domaines de fixation à l'ADN et à l'hormone de tous ces récepteurs a permis de construire un arbre phylogénétique complexe (Figure 6), comportant 6 sous-familles et 26 groupes de protéines (Escriva *et al.*, 1997; Laudet, 1997; NRC, 1999). Toutes les sous-familles contiennent des récepteurs orphelins et les familles IV à VI en sont essentiellement constituées. La sous-famille I comprend les récepteurs des hormones thyroïdes (TR), des rétinoïdes (RAR), de la vitamine D (VDR), de l'ecdysone (EcR) et les récepteurs des activateurs de prolifération des peroxysomes (PPAR). La sous-famille II regroupe les récepteurs des rétinoïdes X (RXR) et la sous-famille III rassemble les récepteurs des hormones stéroïdes.

Chambon et collaborateurs ont suggéré une seconde classification des récepteurs nucléaires en se basant sur leurs caractéristiques fonctionnelles (fixation du ligand, liaison à l'ADN et dimérisation) (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Ainsi, 4 classes ont été créées (Figure 7). La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdiennes (récepteurs des glucocorticoïdes, androgènes, minéralocorticoïdes et progestérone), qui se lient sous forme homodimérique à deux sites spécifiques répétés inversés. Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec le RXR sur deux demi-sites répétés forment la deuxième classe. Les classes III et IV regroupent des récepteurs orphelins, qui se distinguent selon qu'ils se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères ou de monomères.

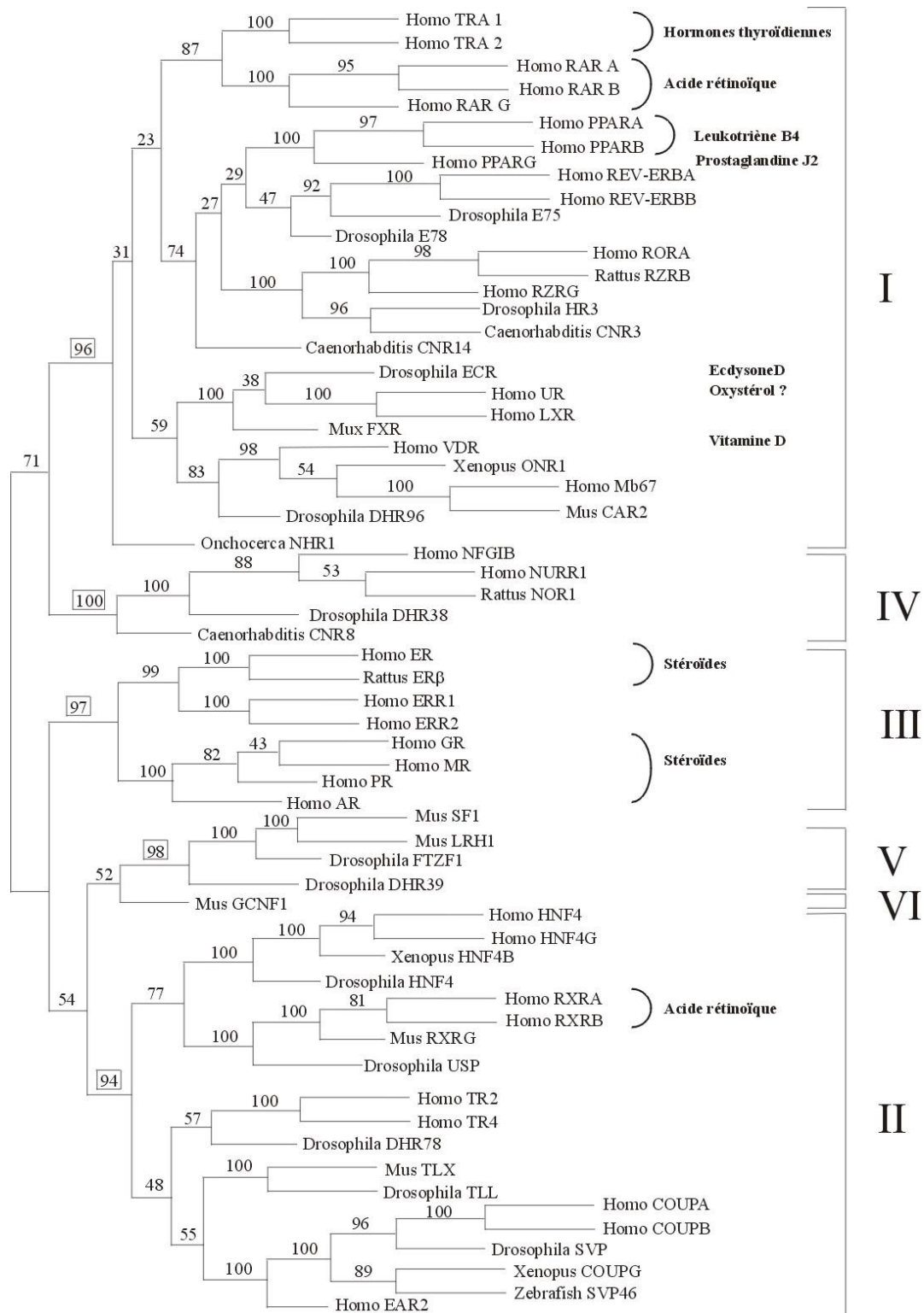


Figure 6 : Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires.

Cet arbre a été établi par alignement de séquences des domaines de liaison à l'ADN (DBD) et à l'hormone (LBD). Les six sous-familles (de I à VI) sont définies pour des groupes de valeurs de "bootstrap" supérieures à 90%, à partir de la base de l'arbre. La sous-famille VI comporte un seul représentant (Mus GCNF1). Les ligands sont indiqués lorsqu'ils sont connus (Escriva *et al.*, 1997; NRC, 1999).

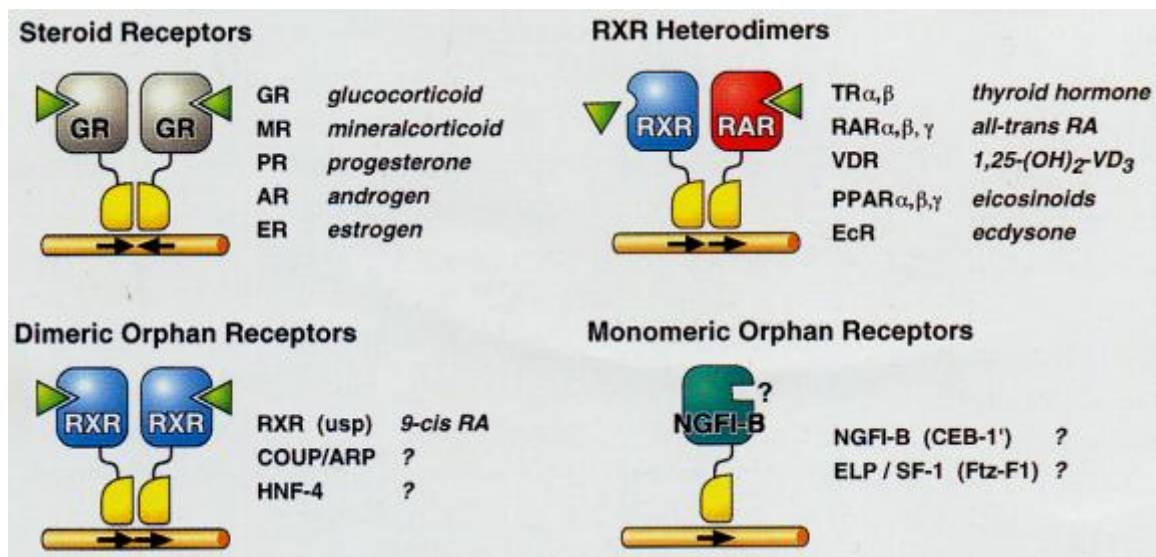


Figure 7 : Classification des récepteurs nucléaires selon leurs propriétés fonctionnelles (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Les récepteurs nucléaires peuvent être regroupés en 4 classes selon leur liaison au ligand, leur fixation à l'ADN et leur dimérisation. RA : acide rétinoïque. Le ? signifie que le ligand de ce récepteur est inconnu.

III.3.2 Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires possèdent une organisation modulaire commune : une région N-terminale A/B impliquée dans la trans-activation indépendante du ligand, un domaine de fixation à l'ADN, C, constitué de deux doigts de zinc, une région charnière D et un domaine de fixation du ligand, E. Certains récepteurs possèdent également un domaine F à l'extrémité N-terminale dont la taille est variable et la fonction peu connue. Une description plus détaillée des différents domaines sera présentée dans la suite de ce manuscrit.

IV. Récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes et cancer

Comme nous l'avons vu précédemment, un dérèglement du fonctionnement ou de la synthèse des hormones peut être la cause d'un cancer. Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à présenter l'implication des récepteurs nucléaires dans deux types de cancer hormono-dépendant ayant une très forte incidence.

IV.1 Cancer du sein

Les œstrogènes (E2) et la progestérone (P) sont des hormones stéroïdiennes synthétisées par les ovaires. Elles sont indispensables au bon développement de la glande mammaire et des autres organes génitaux. Il a été observé que les femmes possédant une concentration circulante en œstrogènes dans le sang trop importante, présentent un risque significativement plus élevé de développer un cancer du sein. De plus, une puberté précoce (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans), une absence de grossesse, une prise de THS (Traitement Hormonal Substitutif) ou de contraception orale sont autant de facteurs augmentant le risque de cancer du sein (Oldenburg *et al.*, 2007).

Dans les cellules cancéreuses mammaires, il a été mis en évidence l'intervention de plusieurs récepteurs nucléaires, notamment celle des récepteurs aux œstrogènes (ER, *Estrogen Receptor*) et à la progestérone (PR, *Progesterone Receptor*). Il existe différents types de cancer du sein classés selon le niveau d'expression de ces protéines. Ainsi un cancer présentant une expression d'un récepteur nucléaire sera qualifié de positif pour ce récepteur (ER+ ou PR+, par exemple). Dans le cas d'une absence du récepteur nucléaire, le cancer sera dit négatif pour ce récepteur (ER- ou PR-, par exemple).

Le récepteur ayant le rôle central dans la tumeur mammaire est le récepteur aux œstrogènes. Il existe deux isotypes du récepteur aux œstrogènes, notés α et β , issus de l'expression de deux gènes distincts situés sur deux chromosomes différents. Les conséquences d'un excès d'œstrogènes circulants sont multiples :

- une sur-activation du récepteur aux œstrogènes va induire sa propre expression ainsi que celle de protéines impliquées notamment dans la prolifération et la survie cellulaire comme le récepteur à la progestérone (Conzen, 2008). L'isotype α du récepteur aux œstrogènes, ER α , est surexprimé dans près de 70% des tumeurs mammaires.

- l'activation du ER α et non celle de ER β par E2 induit celle de la voie PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt) connue pour son implication dans la survie et la prolifération cellulaire (Hisamoto *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2004).
- E2 induit l'expression de la cycline D1 et augmente de 5 à 8 fois l'activité des Cdk4/cycline D1 et Cdk2/cycline E. Ces kinases peuvent alors phosphoryler la protéine du rétinoblastome (Rb) qui séquestre le facteur de transcription E2F. Cette libération permet la reprise du cycle cellulaire (Altucci *et al.*, 1996; Foster et Wimalasena, 1996; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003).
- la métabolisation de E2 peut conduire à la formation de catéchol-œstrogènes qui peuvent être rapidement oxydés en dérivés semi-quinones ou quinones. Les métabolites électrophiles ainsi formés peuvent interagir par liaison covalente avec les bases nucléophiles de l'ADN. Ceci peut être à l'origine de mutations (Abul-Hajj et Cisek, 1988; Liehr, 1990; Liehr et Roy, 1990; Dwivedy *et al.*, 1992; Nutter *et al.*, 1994).
- la présence de E2 induit l'expression du récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR ainsi que celle de IGF-I et IGF-II (*Insulin-like Growth Factor*) dans les cellules cancéreuses mammaires. E2 influence donc la prolifération de la tumeur (Mukku et Stancel, 1985; Lingham *et al.*, 1988; Cullen *et al.*, 1990; Rosen *et al.*, 1991; Peyrat et Bonnetterre, 1992; Lee et Yee, 1995).

Alors que ER α influence la prolifération des cellules cancéreuses, l'isotype β posséderait un rôle antiprolifératif en agissant comme un régulateur négatif de ER α (Tableau 4). De plus, des études ont montré que lorsque ER β forme un hétérodimère avec ER α , l'activité transcriptionnelle de ce dernier est diminuée (Pettersson *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Le récepteur à la progestérone (PR) possède deux isoformes prédominantes, PR-A et PR-B, transcrites d'un même gène, mais issues de l'utilisation de promoteurs différents. Tout comme ER, les deux isoformes de PR fonctionnent différemment : PR-B agit comme un activateur puissant de la transcription de gènes cibles, alors que PR-A est décrit comme un inhibiteur de PR-B. Dans les cellules normales, ces deux isoformes sont exprimées à un niveau équivalent ; le ratio PR-A/PR-B est alors de 1. Il a été montré que si ce rapport est modifié en faveur de l'une ou l'autre des isoformes, le risque que la cellule devienne cancéreuse est accru (Graham *et al.*, 1996).

Tableau 4 : Rôle des différents récepteurs nucléaires dans le cancer du sein (Conzen, 2008).

Récepteurs nucléaires	Expression dans les cellules cancéreuses mammaires	Fonction :	
		proliférative	apoptotique
ER α	Surexpression dans 70% des cas	pro	anti
ER β	Non retrouvé systématiquement Son expression semblerait faible	anti	inconnue
PR-A	Expression corrélée à celle de ER α	pro	anti
PR-B	Non retrouvé systématiquement	inconnue	inconnue
AR	Surexpression dans 48 à 78% des cas	anti	inconnue
GR	Surexpression dans 50% des cas	anti	anti

Le récepteur aux androgènes (AR, *Androgen Receptor*) est essentiel pour le développement des organes reproductifs mâles. Cette protéine est exprimée aussi bien dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses mammaires ER+ et ER- (Agoff *et al.*, 2003). Certains auteurs suggèrent un rôle inhibiteur de AR sur le développement de la tumeur induite par l'œstradiol (de Launoit *et al.*, 1991; Moinfar *et al.*, 2003; Hardin *et al.*, 2007).

Dans le traitement du cancer du sein, les glucocorticoïdes sont administrés aux patientes afin de diminuer les réactions allergiques et les nausées. Mais dans environ 50% de ce type de cancer, il a été observé une surexpression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR, *Glucocorticoid Receptor*) (Horwitz *et al.*, 1975). Des études récentes ont montré que l'activation de cette protéine contribuait à la survie des cellules cancéreuses mammaires (Runnebaum et Bruning, 2005; Belova *et al.*, 2009). Par conséquent, l'administration de glucocorticoïdes conduit à une inefficacité des traitements utilisant des molécules chimiques pro-apoptotiques. Il est donc important de connaître l'expression de GR dans les cellules cancéreuses, afin de prescrire un traitement efficace aux patientes.

IV.2 Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent derrière le cancer du poumon et le cancer colo-rectal (Figure 1). Deux récepteurs aux stéroïdes sont impliqués dans le développement et le bon fonctionnement de la prostate : le récepteur aux androgènes (AR, *Androgen Receptor*) et le récepteur aux œstrogènes (ER, *Estrogen Receptor*) dont le rôle est indirect. Une surexpression de ces deux protéines est corrélée avec la présence d'un cancer de la prostate. Dans les cellules cancéreuses prostatiques, il a été observé une surexpression du récepteur aux androgènes mais aussi une augmentation de sa sensibilité aux hormones. De

plus, localement, la production d'androgènes est accélérée (Gregory *et al.*, 2001; Holzbeierlein *et al.*, 2004). Dans les cellules normales, le AR est activé par la testostérone et la DHT (Dihydrotestostérone) seulement, mais dans les cancers métastatiques, il a été observé des mutations de AR lui permettant de fixer des ligands inhabituels (anti-androgènes, œstrogènes, progestérone) (Taplin *et al.*, 1999). Toutes ces dérégulations permettent à la cellule de recevoir un maximum de réponses hormonales, afin de se développer et de proliférer plus rapidement et donc d'engendrer un cancer.

Le récepteur aux œstrogènes est également présent au sein de la prostate. Il n'a pas un rôle direct dans la différenciation et le développement de la prostate, car les souris délétées des gènes codant pour le récepteur aux œstrogènes ont une prostate normale (Ellem et Risbridger, 2007). Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes ont un effet opposé dans les cellules cancéreuses prostatiques. Alors que ER α joue un rôle dans la prolifération et la survie de ces cellules, ER β intervient dans l'apoptose et dans des mécanismes anti-prolifératifs (McPherson *et al.*, 2007).

Dans la suite de ce mémoire, nous nous attacherons à étudier un seul récepteur nucléaire : le récepteur aux œstrogènes. Il est impliqué dans de nombreux mécanismes de cancérogénèse, mais son mode d'action dans les cellules normales et cancéreuses reste toujours inconnu.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : RECEPTEUR AUX ŒSTROGENES

I. Généralités

Le récepteur aux œstrogènes (ER) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. Il existe trois formes de récepteurs aux œstrogènes : ER α , ER β et ER γ (ou ER β a). Les isotypes α et β sont retrouvés chez toutes les espèces alors que l'isotype γ n'a été identifié que chez certaines espèces de poissons (Hawkins *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000; Menuet *et al.*, 2002).

II. Isotypes du récepteur aux œstrogènes humain : hER α et hER β

Depuis les années 1950, l'implication du 17 β -œstradiol (E2) (œstrogène dont le taux circulant est le plus élevé chez l'homme) dans la croissance des organes reproductifs et la physiologie de la reproduction chez la femme est connue. Par contre, les processus biochimiques mis en jeu ne sont pas clairement identifiés. Dans les années 1960, Jensen et Jacobson ont démontré que l'œstradiol ne subit pas de modification chimique et qu'il était retenu au niveau des tissus du tractus génital de la ratte (Jensen et Jacobson, 1960; 1962). Ces résultats ont permis à Jensen d'envisager l'existence d'une molécule fixant l'œstradiol dans ces organes. Il l'appela l'œstrophiline qui prendra plus tard le nom de récepteur aux œstrogènes (Jensen, 1966). Les laboratoires ont entrepris la purification du récepteur aux œstrogènes. Du fait de sa faible concentration dans les tissus cibles, cette purification a nécessité une décennie (Greene *et al.*, 1980). L'équipe du Pr Chambon a, en 1985, séquencé pour la première fois l'ADNc du récepteur aux œstrogènes à partir de cellules épithéliales mammaires cancéreuses de la lignée MCF-7, aujourd'hui appelé hER α (Walter *et al.*, 1985). Durant les 10 années qui suivirent, ER α était considéré comme l'unique médiateur de l'effet des œstrogènes. Pourtant, en 1996, un second récepteur a été découvert dans la prostate du rat, noté ER β (Kuiper *et al.*, 1996). Cet isotype a ensuite été caractérisé chez d'autres espèces, et en particulier chez l'homme (Mosselman *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1998b). Cette découverte a permis de rendre compte d'effets des œstrogènes dans d'autres tissus, autres que ceux impliqués dans la fonction de reproduction chez la femme, tels que l'appareil génital masculin et le cerveau.

II.1 Organisation génomique

Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes, hER α et hER β , sont issus de la transcription de gènes différents (respectivement ESR1 et ESR2). Ces gènes sont présents sur des chromosomes distincts : ESR1 se trouve sur le chromosome 6 (locus 6q25.1) alors que ESR2 est localisé sur le chromosome 14 (14q23-24.1) (Menasce *et al.*, 1993; Mosselman *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1997). ESR1 et ESR2 contiennent 8 exons séparés par 7 introns ; ils s'étendent respectivement sur environ 140 et 40 kilobases. ESR1 code pour une protéine contenant 595 acides aminés d'une masse moléculaire apparente de 66 kDa. Le produit du gène ESR2 est une protéine de 530 résidus aminoacides ayant une masse moléculaire apparente de 59 kDa.

Différentes isoformes issues soit d'épissage alternatif soit de l'utilisation d'un promoteur différent ont été décrites. Au moins quatre isoformes de hER α et cinq isoformes de hER β ont été identifiées (Nilsson *et al.*, 2001; Ascenzi *et al.*, 2006; Dahlman-Wright *et al.*, 2006). Flouriot et collaborateurs ont mis en évidence dans les cellules MCF-7, la présence d'un mutant d'un récepteur aux œstrogènes de type α dont la séquence est dépourvue des 173 premiers résidus aminoacides pour une masse moléculaire apparente de 46kDa (isoforme notée hER α 46). Ils ont également montré que lorsque les deux isoformes de masse moléculaire apparente de 66 kDa (hER α) et 46kDa (hER α 46) sont co-exprimées, hER α 46 inhibe l'activité de hER α 66 en formant un hétérodimère (Flouriot *et al.*, 2000; Penot *et al.*, 2005). Ce récepteur, hER α 46, a été identifié dans des ostéoblastes humains (Denger *et al.*, 2001) ainsi que des cellules endothéliales vasculaires humaines (Russell *et al.*, 2000).

D'autre part, l'isoforme hER β cx (ou hER β 2), résultat de l'utilisation d'un exon alternatif, ne peut fixer de ligands et est apparue comme étant un suppresseur de l'activité de hER α mais pas celle de hER β (Ogawa *et al.*, 1998b).

Ces variants, dominants négatifs de l'activité de hER α , auraient donc un rôle dans la régulation de la transcription des gènes œstrogéno-dépendants et dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

II.2 Répartition tissulaire et fonctions

ER α et ER β peuvent être détectés dans un grand nombre de tissus. Dans certains organes, les deux types de récepteurs sont présents en quantité similaire alors que dans d'autres, l'un ou l'autre prédomine. Dans certains tissus, les deux récepteurs aux œstrogènes peuvent être exprimés mais dans des cellules différentes. Ainsi, ER α est essentiellement exprimé dans les organes génitaux féminins [utérus, ovaires (cellules de la thèque), glande mammaire] et masculins [stroma prostatique, testicules (cellules de Leydig), épидидymes], mais aussi dans les os, le foie et certaines régions du cerveau. L'isotype β du récepteur aux œstrogènes est retrouvé principalement dans le colon, les cellules épithéliales de la prostate, les testicules, les cellules de la granulosa (ovaires), la moelle épinière, les glandes salivaires et certaines régions du cerveau (Dahlman-Wright *et al.*, 2006). De nombreux auteurs rapportent que ER β possède un effet antiprolifératif contrairement à ER α (Weihua *et al.*, 2003; Koehler *et al.*, 2005; Ascenzi *et al.*, 2006). Des études *in vitro* indiquent que ER β est un modulateur important de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses (Lazennec *et al.*, 2001). Afin de comprendre le rôle des deux isotypes du récepteur aux œstrogènes dans chacun de ces types cellulaires, des souris transgéniques déficientes en l'un des deux ERs ont été produites ; les souris α ERKO et β ERKO sont respectivement dépourvues de ER α et de ER β . Contrairement aux souris β ERKO, les rongeurs α ERKO présentent des anomalies morphologiques. L'absence de ER α provoque chez les femelles une immaturité du tractus reproductif, un développement incomplet des glandes mammaires et une insensibilité aux œstrogènes. Les souris mâles ont une atrophie testiculaire et présentent une fertilité diminuée provoquée par une maturation incomplète des spermatozoïdes. Quel que soit le sexe des rongeurs, une diminution modeste de la densité osseuse est observée et le système cardiovasculaire est altéré. Les femelles β ERKO montrent une réduction de leur fonction ovarienne et les mâles développent avec l'âge une hyperplasie prostatique, les deux sexes étant fertiles. Des souris présentant une double délétion ($\alpha\beta$ ERKO) ont également été produites et les anomalies sont quasiment identiques à celles des souris α ERKO. La modification la plus importante est observée au niveau de l'ovaire adulte avec l'apparition de structures ressemblant à des tubes séminifères. Des comparaisons de ces phénotypes ($\alpha\beta$ ERKO) avec des souris déficientes en aromatase, enzyme intervenant dans la synthèse des œstrogènes, montrent des différences : les femelles $\alpha\beta$ ERKO présentent une stérilité partielle, les femelles déficientes en aromatase présentent une stérilité provoquée par une absence de développement

des organes génitaux externes, de l'utérus et des glandes mammaires. Les deux sexes montrent une anomalie dans la distribution des graisses. L'effet de l'œstradiol n'est donc pas exclusivement médié par les récepteurs aux œstrogènes α et β ; en effet, d'autres voies de signalisation des œstrogènes existent (Couse et Korach, 1999; Pettersson et Gustafsson, 2001; Ascenzi *et al.*, 2006).

III. Structure

Les récepteurs aux œstrogènes humains α et β , comme tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire. Chambon et collaborateurs ont mis en évidence, par comparaison des séquences des récepteurs aux œstrogènes humains et de poulet, la présence de six domaines structuraux qu'ils ont notés de A à F de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (Krust *et al.*, 1986) (Figure 8). Un ensemble de délétions de ces domaines structuraux a permis d'identifier 5 domaines fonctionnels, les domaines A et B ne présentant pas de fonctions distinctes.

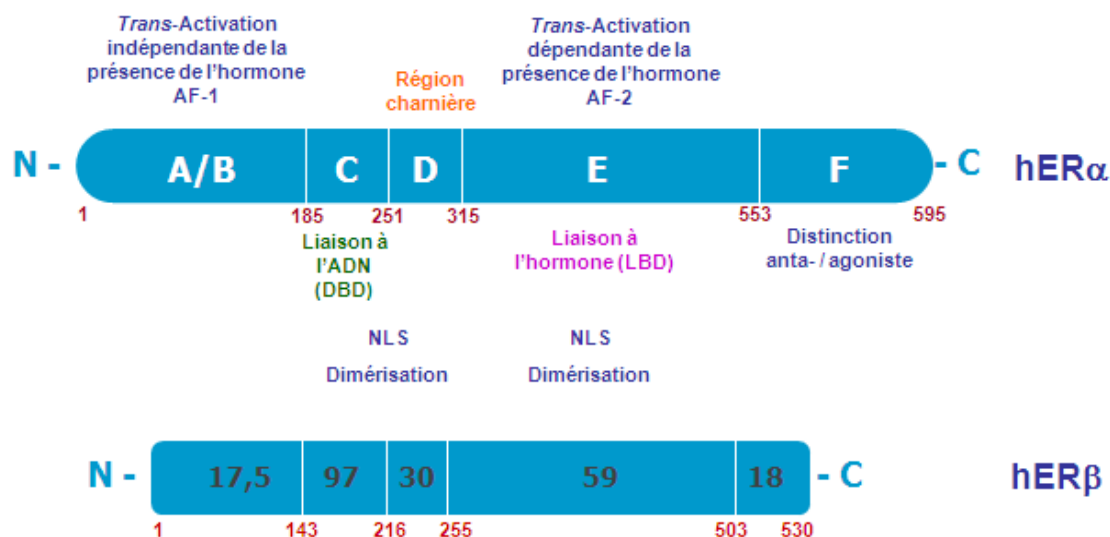


Figure 8 : Organisation structurale et fonctionnelle des isotopes α et β du récepteur aux œstrogènes humain.

Les deux récepteurs humains possèdent 6 domaines structuraux (notés de A à F) mais seulement 5 domaines fonctionnels. Cette figure présente également le pourcentage d'homologie de séquence des différents domaines de ces deux récepteurs (chiffres noirs). Les chiffres rouges représentent la numérotation en résidus aminoacides dans la séquence. AF-1 : *Activation Function-1* ; AF-2 : *Activation Function-2* ; DBD : *DNA Binding Domain* ; LBD : *Ligand Binding Domain* ; NLS : *Nuclear Localization Site*.

III.1 Domaine N-terminal A/B

Le domaine A/B est le domaine présentant la plus grande variabilité entre les espèces, aussi bien en taille qu'en homologie de séquences (Figure 8). Il est constitué de 184 résidus aminoacides dans le cas de l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain et 148 pour l'isotype β humain. Ces domaines ne présentent qu'environ 17% d'homologie de séquence entre les deux isotypes humains. Cette région présente une fonction de *trans*-activation qui active constitutivement l'expression de gènes cibles en l'absence d'hormone (AF-1), des sites de phosphorylation et de sumoylation. L'activité ligand-indépendante de AF-1 suppose une liaison directe ou indirecte *via* des coactivateurs ou corépresseurs à des composants de la machinerie globale de la transcription. D'autre part, il a également été montré que la fonction AF-1 présente des spécificités cellulaires et de promoteur. Hall et McDonnell ont analysé la capacité du domaine AF-1 de hER α et hER β à activer seule la transcription d'un gène rapporteur. Ils observent que le domaine N-terminal de hER β ne possède pas d'activité transcriptionnelle autonome contrairement à hER α . Ils émettent l'existence d'un domaine répresseur qui diminuerait l'activité transcriptionnelle globale du hER β en masquant sa fonction AF-1 (Hall et McDonnell, 1999). Le récepteur aux œstrogènes possède une deuxième région ayant une fonction de *trans*-activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2). AF-1 et AF-2 agissent en synergie car lorsqu'ils sont isolés, l'activité du récepteur est plus faible que lorsqu'ils sont réunis (Danielian *et al.*, 1992; Hall et McDonnell, 1999).

De nombreuses études ont été menées afin d'établir la structure secondaire de ce domaine. Elles ont permis de montrer qu'en solution, cette région n'était pas structurée mais l'existence de nombreux résidus chargés négativement et hydrophobes suggère l'existence de structures secondaires telles que des hélices- α amphipatiques. L'insertion de résidus proline dans la séquence (résidus connus pour interrompre les structures secondaires) a pour conséquence une inhibition de l'activité du récepteur supposant fortement la présence et l'importance de ces structures (Dahlman-Wright *et al.*, 1995).

III.2 Domaine C : DNA Binding Domain (DBD)

Le domaine C, constitué d'une soixantaine de résidus aminoacides est responsable de la liaison à l'ADN. Ce domaine est très largement conservé inter- et intra-espèce. Il présente environ 92% d'homologie de séquences entre hER α et hER β . Contrairement à la région N-terminale, la structure tridimensionnelle de cette région est connue : elle est constituée de deux hélices- α perpendiculaires l'une par rapport à l'autre, d'un feuillet β antiparallèle (Figure 9) et de deux motifs en doigt de zinc (Figure 10) contenant chacun quatre résidus cystéine hautement conservés coordonnés à un atome de zinc (Schwabe *et al.*, 1990; Schwabe *et al.*, 1993; Luisi *et al.*, 1994).

Le DBD des récepteurs aux œstrogènes peut être divisé en deux sous-domaines qui diffèrent par leur structure et leur fonction. Le premier sous-domaine contient la boîte proximale ou P-box impliquée dans la reconnaissance de l'ADN et l'interaction avec le grand sillon de l'ADN (Figure 10). Il se situe au niveau de l'hélice 1 dans le premier doigt de zinc CI et est constitué de résidus aminoacides indispensables pour la spécificité de la reconnaissance de l'ERE (Eléments de Réponse aux Œstrogènes, séquences d'ADN sur lesquelles se lie spécifiquement le récepteur aux œstrogènes) par le récepteur aux œstrogènes (Mader *et al.*, 1989). En effet, une substitution de ces résidus par ceux de la P-box du récepteur aux glucocorticoïdes permet au récepteur chimère de se lier non plus à un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) mais aux glucocorticoïdes (GRE) (Danielsen *et al.*, 1989). Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes possèdent ces mêmes acides aminés spécifiques.

Le second sous-domaine du DBD contient la boîte distale ou D-box. Elle est constituée d'une boucle de 5 acides aminés situés entre deux résidus cystéine du second doigt de zinc CII et est impliquée dans la dimérisation du récepteur. En effet, le récepteur aux œstrogènes, comme tous les récepteurs nucléaires, se lie à l'ADN sous forme de dimère. Il a été montré que les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), séquences nucléotidiques spécifiquement reconnues par le récepteur, sont constituées de deux demi-sites hexanucléotidiques et plus précisément de séquences palindromiques répétées inversées permettant chacun la liaison à un monomère du ER. Une fois le premier monomère fixé, le second monomère interagit avec l'ERE de manière coopérative avec une affinité plus importante que celle du premier monomère. La D-box n'est pas seulement impliquée dans l'interface de dimérisation mais aussi dans la discrimination de l'espacement entre les demi-sites formant l'ERE. Elle est également nécessaire pour stabiliser le complexe protéine-ADN.

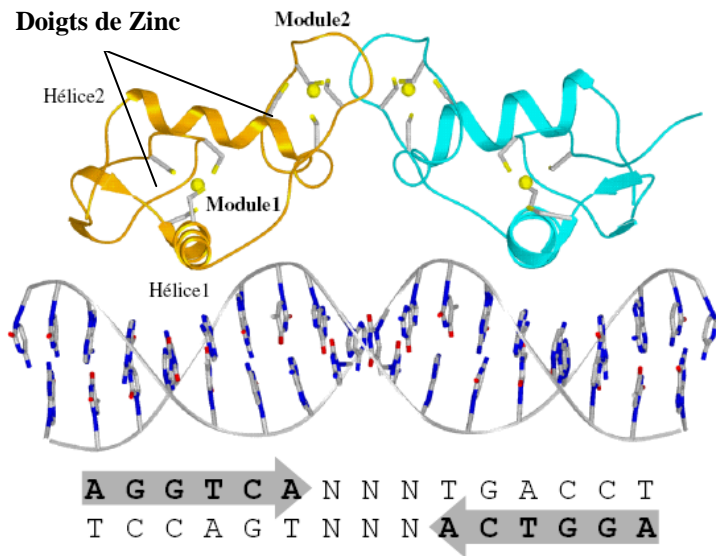


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de l'homodimère du DBD du hER α fixé sur une séquence consensus de l'Element de Réponse aux Œstrogènes (ERE_{cs}).

Les monomères représentés en orange et bleu sont parfaitement symétriques reflétant la structure palindromique de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Les modules 1 et 2 comportent respectivement les doigts de zinc CI et CII et correspondent respectivement à la Boîte P (P-box) et à la boîte D (D-Box).

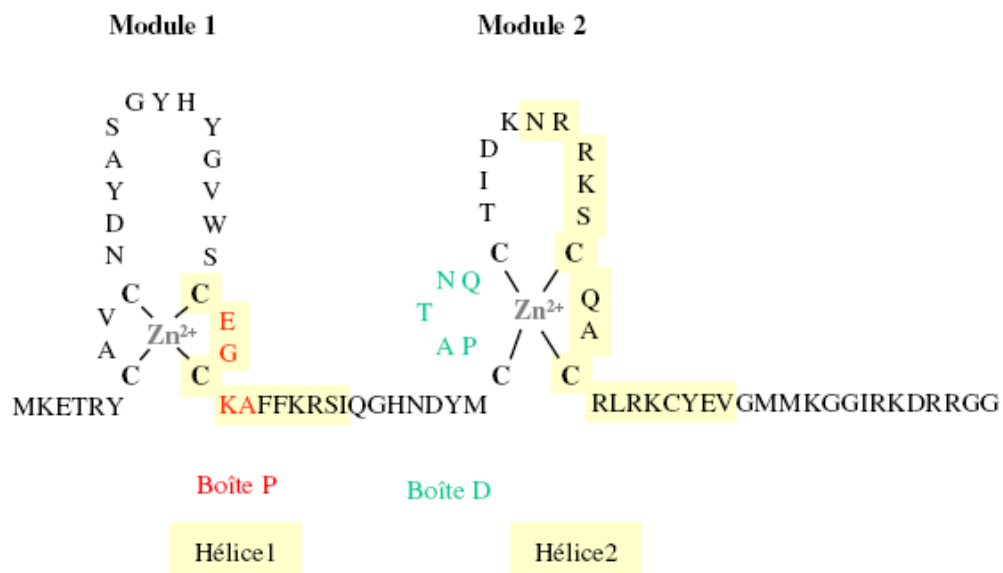


Figure 10 : Séquence en acides aminés des deux motifs en doigt de zinc CI et CII du DBD de hER α .

Les modules 1 et 2 contiennent respectivement les doigts de zinc CI et CII. Les acides aminés représentés en rouge et en vert appartiennent respectivement à la boîte P (P-box) et la boîte D (D-Box). La P-box est impliquée dans la reconnaissance de l'ERE et la D-box dans la dimérisation du récepteur.

III.3 Domaine D : Région charnière

Le récepteur aux œstrogènes comme tous les récepteurs nucléaires possède une région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de fixation du ligand. Cette région est très peu conservée entre les espèces et sa structure tridimensionnelle n'est pas connue. Sa caractéristique principale est son importante flexibilité permettant une rotation du DBD pouvant aller jusqu'à 180°. Le récepteur possède alors la capacité de s'adapter aux différents éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) rencontrés ainsi qu'aux différents modes de dimérisation (homo- ou hétérodimérisation). Cette région est aussi impliquée dans le recrutement de protéines chaperonnes, de coactivateurs et dans l'interaction avec le cytosquelette intranucléaire (ou matrice nucléaire) (Pasqualini *et al.*, 2001).

Le domaine D de hER α présente trois séquences particulières impliquées dans le passage du récepteur à travers l'enveloppe nucléaire (Figure 11) ; ce sont des séquences NLS (*Nuclear Localization Signal*) (Picard et Yamamoto, 1987; Picard *et al.*, 1990; Ylikomi *et al.*, 1992). Ces trois séquences sont constitutives et agissent en coopération. Une quatrième séquence serait retrouvée au niveau du domaine C et ne serait fonctionnelle qu'en présence de ligand (Picard et Yamamoto, 1987; Picard *et al.*, 1990; Ylikomi *et al.*, 1992). L'alignement de séquences des deux isotypes α et β du hER montre que hER β présente deux séquences NLS homologues à celles retrouvées chez hER α .

En comparant la séquence primaire de hER α avec les séquences d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*) identifiées dans la séquence de la protéine kinase I et celle de p53, Lee et Bai suggèrent l'existence d'un NES chez hER α entre les résidus aminoacides 306 et 322 (Lee et Bai, 2002) ; hER β possède une séquence fortement homologue.

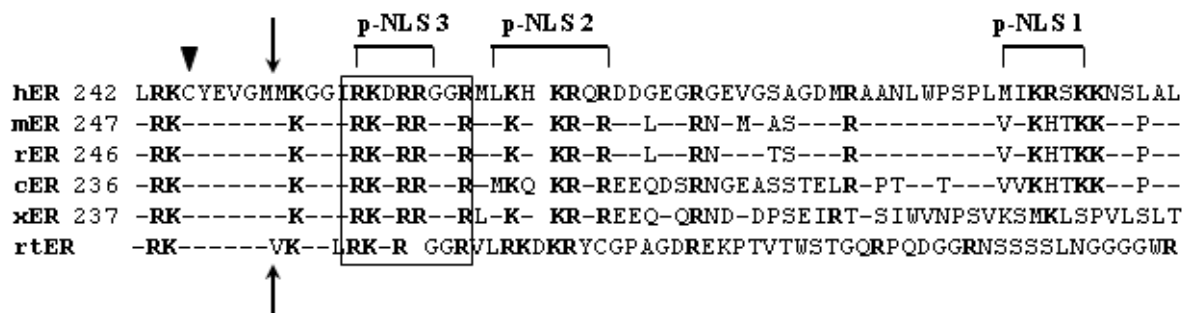


Figure 11 : Signaux de localisation nucléaire (NLS) des récepteurs aux œstrogènes.

Alignement des séquences à la jonction des domaines C/D. Le dernier résidu cystéine de la région C est indiqué par le triangle. Les résidus aminoacides chargés positivement (lysine et arginine) sont en gras. La région encadrée correspond au motif conservé dans toute la superfamille des récepteurs nucléaires. L'extrémité C-terminale du domaine C est indiquée par deux flèches en vis-à-vis. Ces séquences correspondent à l'isotype α des récepteurs aux œstrogènes. hER : récepteur aux œstrogènes humain ; mER : de souris ; rER : de rat ; cER : de poulet ; xER : de xénope et rtER : de truite (Ylikomi *et al.*, 1992).

III.4 Domaine E : Ligand Binding Domain (LBD)

Le domaine E est un domaine possédant de multiples fonctions. Outre son rôle déterminant dans la fixation du ligand, il présente également une interface de dimérisation, une fonction de *trans*-activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2) ainsi que des sites de fixation de coactivateurs et de HSP90. C'est un domaine globulaire constitué d'environ 250 résidus aminoacides. Le domaine E est le second domaine le plus conservé entre les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes.

III.4.1 Architecture générale

Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain présentent environ 60% d'homologie de séquence. D'autre part, les LBD des récepteurs aux stéroïdes possèdent une séquence tridimensionnelle commune. De nombreuses structures cristallographiques de ce domaine ont été publiées (LBD lié à différentes hormones ou corégulateurs) et révèlent qu'il adopte un repliement canonique (Figure 12). Cette structure canonique comprend 12 hélices- α , notées de H1 à H12 disposées en trois couches formant un motif en « sandwich à hélices- α antiparallèles » (Wurtz *et al.*, 1996; Moras et Gronemeyer, 1998; Kumar et Thompson, 1999;

Ruff *et al.*, 2000). Un feuillet β formé de deux brins antiparallèles est également retrouvé au sein de cette structure et localisé près de l'hélice- α H3. Le LBD du récepteur aux œstrogènes à la particularité de ne pas posséder l'hélice- α H2.

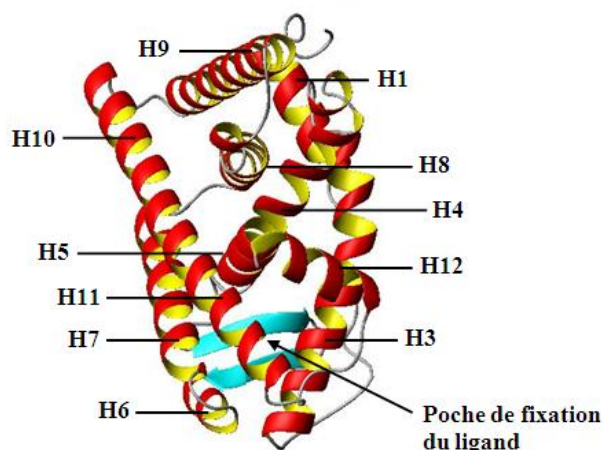


Figure 12 : Structure canonique du monomère LBD de l'isotype α humain du récepteur aux œstrogènes complexé au 17 β -œstradiol.

Le domaine de fixation à l'hormone adopte un repliement particulier grâce aux onze hélices- α (notées de H1 à H12) qu'il comporte. Cette représentation a été réalisée avec le logiciel MolMol (N° Accession PDB : 1ERE). Le ligand ne figure pas sur ce schéma.

III.4.2 Sites de fixation du ligand

Le site de fixation du ligand se trouve enfoui dans une poche de la matrice protéique Figure 12. C'est une large cavité majoritairement hydrophobe et scellée où E2 n'occupe que 50% de l'espace. Ceci pourrait expliquer la capacité du récepteur à fixer un grand nombre de stéroïdes ou autres composés. La cavité hydrophobe est délimitée par les hélices H3, H6, H8, H11 et H12 ainsi que les coudes reliant les hélices H6 et H7 et le feuillet β . Seuls deux résidus aminoacides de la poche de fixation diffèrent entre hER α et hER β ; L384/M421 chez hER α correspondent à M336/I373 chez hER β .

Récemment, une deuxième poche de fixation a été identifiée sur hER β (Wang *et al.*, 2006). Des études antérieures montraient que le récepteur aux œstrogènes fixait deux fois plus de molécules de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) que de 17- β -œstradiol (E2) (Hedden *et al.*, 1995; Tyulmenkov et Klinge, 2000). Les auteurs émettent donc l'hypothèse de l'existence d'une seconde poche de fixation où l'anti-œstrogène exercerait son effet antagoniste (l'effet agoniste serait lié à la fixation dans la cavité « classique ») (Jensen et Khan, 2004). La structure cristalline du LBD de hER β complexé à deux molécules de 4-OHT a été publiée (Wang *et al.*, 2006). Une des deux molécules est localisée dans la poche de fixation « classique » alors que la seconde est retrouvée dans le sillon hydrophobe du site de fixation des coactivateurs formé par les hélices H3, H4, H5 et H12. La structure cristalline du LBD de hER α publiée par Shiao et collaborateurs ne présente qu'une seule molécule de 4-OHT liée

(Shiau *et al.*, 1998). Mais, les résidus responsables de l'interaction avec la seconde molécule de 4-OHT étant hautement conservés entre les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain, l'existence d'un second site de fixation dans hER α est fortement envisagée (Kojetin *et al.*, 2008).

III.5 Changements conformationnels induits par le ligand

Ces modifications de conformation provoquées par la fixation de ligands sont communément appelées « mécanisme de la souris » (Bourguet *et al.*, 1995). Sous l'effet de la fixation d'un ligand, le LBD subit une compaction. Ce changement conformationnel concerne 3 hélices- α : H3, H11 et H12. La Figure 13 montre les mouvements des hélices- α induits par la ligandation du récepteur aux acides 9-*cis* et tout-*trans* rétinoïque (RXR). Ces mouvements sont identiques à ceux observés pour le ER mis à part l'absence de l'hélice- α H1 dans le ER. En absence d'hormone, H11 stabilise la poche de fixation en la remplissant de ces résidus apolaires. Certains résidus de H3 peuvent interagir avec le ligand entraînant un mouvement de l'hélice suivi par un déplacement de l'hélice- α H11. Une surface d'interaction avec le ligand est alors générée ainsi que le repositionnement de l'hélice H12 (position stabilisée par les hélices H3, H5 et H11) laissant accessible le site de reconnaissance et de fixation des coactivateurs (Brzozowski *et al.*, 1997). La conformation adoptée par le récepteur aux œstrogènes humain α en présence du 17 β -œstradiol ou du diéthylstilbestrol (DES), deux agonistes, est identique. La fixation d'un antagoniste comme le 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) ou le raloxifène (Ral) a pour effet de déplacer l'hélice H12 dans une position masquant le site d'interaction des coactivateurs (Figure 14). En effet, ces ligands portent des chaînes latérales encombrantes qui débordent de la poche de fixation de l'hormone et pointent vers l'hélice H12 provoquant une contrainte stérique. La structure adoptée par hER β en présence de ligands est similaire à celle de hER α (Pike *et al.*, 1999; Shiau *et al.*, 2002).

La fixation du second ligand antagoniste au niveau du site de reconnaissance des coactivateurs implique des liaisons hydrophobes ainsi que des interactions de Van der Waals. Comparée à celle rencontrée dans les structures représentant des LBD complexés à un agoniste ou un antagoniste, la position de l'hélice H12 est atypique. Cette conformation est encore mal comprise. D'autres études ont montré que cette séquence était présente au niveau du LBD (Saporita *et al.*, 2003; Lombardi *et al.*, 2008).

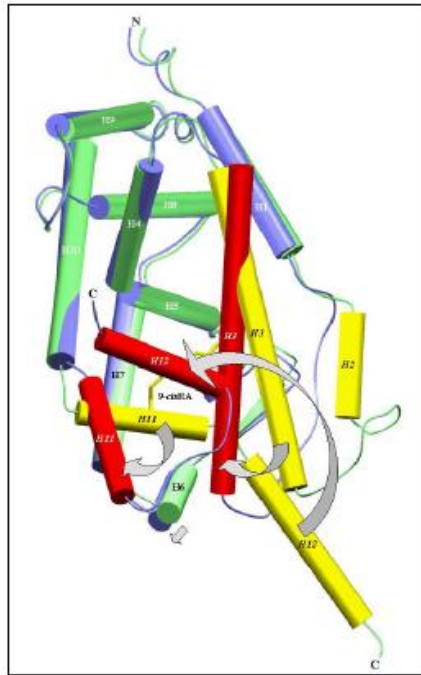


Figure 13 : Modifications conformationnelles du LBD de hRXR α induites par la liaison à un ligand (Egea *et al.*, 2000; Gangloff, 2000).

Superposition des structures ligandé (en bleu) et non ligandé (en vert) du récepteur aux acides 9-*cis* et tout-*trans* rétinoïque (RXR). Les éléments de structure secondaire subissant les réarrangements conformationnels les plus importants sont dessinés en jaune pour la forme apo et en rouge pour la forme holo. Les flèches mettent l'accent sur les principaux mouvements des hélices- α lors de la ligandation du récepteur.

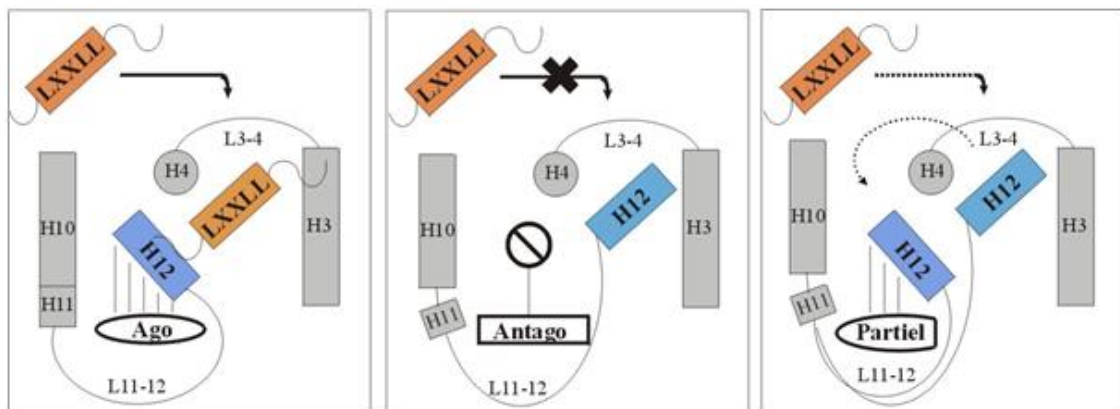


Figure 14 : Modifications conformationnelles du LBD de hER α induites par la liaison à un ligand agoniste ou antagoniste.

Les ligands agonistes (Ago) induisent un repositionnement de l'hélice H12 (qui est alors fermement stabilisée) de telle sorte que le site de fixation des coactivateurs (symbolisé par le motif LXXLL) soit démasqué. Au contraire, la liaison à un ligand antagoniste (Antago), présentant des groupements substitués (cercle barré), entraîne une modification du LBD défavorable à l'interaction avec les coactivateurs. En présence d'anta-/agoniste partiel (Partiel), la conformation stable n'est pas directement induite. Néanmoins le positionnement de l'hélice H12 n'est pas empêché par un groupement créant une gêne stérique, la conformation stable pour l'interaction avec la "NR" box peut donc être prise, au moins transitoirement (Bourguet *et al.*, 2000; Bouter, 2003).

III.5.1 Interaction avec les corégulateurs

Les coactivateurs portent tous un motif appelé NR-box dont la séquence consensus est LXXLL (L pour leucine et X pour un résidu quelconque) (Le Douarin *et al.*, 1996; Heery *et al.*, 1997). Le site de reconnaissance de coactivateurs est constitué de résidus appartenant aux hélices- α H3, H4, H5 et H12 ainsi que le coude formé entre les hélices H3 et H4 et présente une surface majoritairement hydrophobe. Le peptide portant le motif LXXLL adopte une structure en hélice- α amphipatique complémentaire à cette surface hydrophobe et est stabilisé par des interactions électrostatiques formées entre deux résidus chargés hautement conservés dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Il s'agit de la lysine K362 localisée sur l'hélice H3 de hER α et de la glutamine E542 présente sur l'hélice H12. Les ligands ainsi que les coactivateurs se fixent sur le LBD de hER β de la même manière que pour hER α .

La fixation des corépresseurs est à ce jour mal comprise mais elle semble être très complexe. Heldring et collaborateurs ont proposé de regrouper les corépresseurs en quatre classes (Heldring *et al.*, 2007). La première classe rassemble les corépresseurs possédant un motif appelé CoRNR-box dont la séquence consensus est LXXXIXXXL. La seconde catégorie regroupe les corépresseurs possédant une NR-box. Ils entrent donc directement en compétition avec les coactivateurs. Les corépresseurs n'interagissant pas avec le LBD *via* une NR-box ou une CoRNR-box forment la troisième classe. Et enfin, la classe 4 contient les corépresseurs qui agissent indirectement et peuvent être recrutés *via* des complexes protéiques. L'hélice H12 possède une CoRNR-box. Elle est donc capable d'occuper le site de fixation des corépresseurs et éviter des interactions avec d'autres corépresseurs.

III.5.2 Activation Function-2 (AF-2)

Le LBD contient une fonction de *trans*-activation de la transcription dépendante du ligand où l'hélice H12 joue un rôle direct. Cette fonction suffit à *trans*-activer un gène rapporteur et est appelée AF-2 AD (pour *Autonomous Domain*). Une autre région située entre les hélices H1 et H3 est également impliquée dans cette fonction AF-2 et est notée AF-2a. Elle fonctionne de manière constitutive seulement lorsqu'elle est associée au DBD. Sa fonction est réprimée par la région AF-2 AD, cette répression étant levée par la présence d'agoniste (Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; Pierrat *et al.*, 1994; Norris *et al.*, 1997).

III.5.3 Interface de dimérisation

La surface de dimérisation inclut les hélices H8 à H11 mais la surface de contact la plus importante est située sur l'hélice H10. Cette dernière interagit *via* une interaction hydrophobe de type leucine zipper et des contacts hydrophiles par des liaisons hydrogène directes ou médiées par l'eau. La surface de dimérisation du LBD du récepteur aux œstrogènes représente environ 15 % (soit environ 1700Å²) de la surface accessible par monomère. Il a également été observé que l'hélice H11 établissait un contact avec le ligand suggérant une relation entre dimérisation et ligandation (Bourguet *et al.*, 1995; Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999).

III.6 Domaine F

Le domaine F est le domaine se situant à l'extrémité carboxy-terminale du récepteur aux œstrogènes. Il est désigné par les 45 derniers résidus aminoacides pour hER α et les 30 derniers pour hER β et présente peu d'homologie de séquence (18% entre les deux isotypes humains). Ce domaine n'existe pas chez toutes les espèces et relativement peu d'études ont été menées afin d'élucider sa fonction. Il a été montré, dans différents contextes cellulaires, que la délétion du domaine F influence la sensibilité du récepteur aux œstrogènes vis-à-vis des œstrogènes et des anti-œstrogènes (Montano *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 2002; Skafar et Koide, 2006; Koide *et al.*, 2007). De plus, la présence de cette région diminue la capacité de dimérisation du récepteur et par conséquent diminue son activité transcriptionnelle (Peters et Khan, 1999; Yang *et al.*, 2008).

IV. Ligands : œstrogènes et anti-œstrogènes

L'équipe de Katzenellenbogen a développé le concept de pharmacologie tripartite du récepteur aux œstrogènes (Figure 15) pour expliquer l'action tissu-spécifique des œstrogènes sur ces récepteurs (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000). Ainsi trois facteurs influenceraient l'action sélective du récepteur : (i) la nature du ligand, (ii) le type ou l'isotype du récepteur avec lequel le ligand forme le complexe ligand-récepteur et (iii) l'interaction du complexe avec les ERE et les corégulateurs.

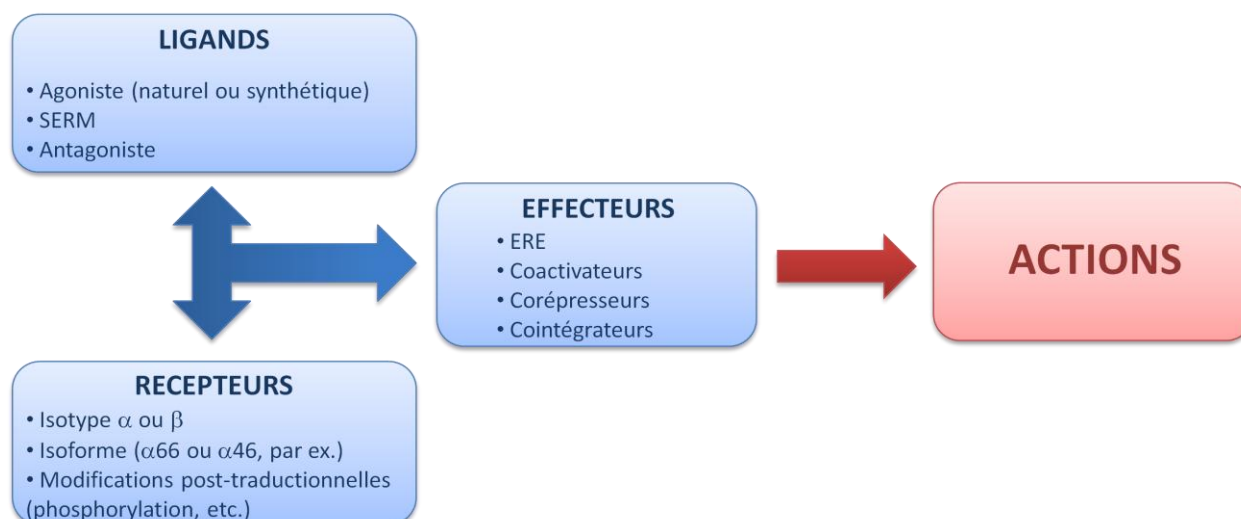


Figure 15 : Pharmacologie tripartite du récepteur aux œstrogènes adaptée de Katzenellenbogen et Katzenellenbogen (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 2000).

Comme nous l'avons vu précédemment, en présence d'œstrogènes, l'hélice- α H12 du récepteur aux œstrogènes est dans une conformation favorable à l'interaction des coactivateurs avec le domaine AF-2. La machinerie de transcription peut être recrutée et la transcription du gène cible effectuée. L'activité agoniste ou non d'un ligand sera déterminée par sa capacité à placer cette hélice- α H12 dans la conformation idéale permettant de « découvrir » le site AF-2 aux coactivateurs, comme le fait E2, et non par son affinité avec les récepteurs aux œstrogènes.

IV.1 Agonistes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes lipophiles à 18 atomes de carbone (Tableau 5), synthétisées principalement dans les ovaires, les testicules et les tissus périphériques. Les œstrogènes constituent une famille de trois membres : l'œstrone (E1), en équilibre réversible avec E2, le 17 β -œstradiol (E2), l'œstrogène endogène possédant le taux circulant le plus élevé et l'œstriol (E3), métabolite urinaire et placentaire majoritaire. L'œstradiol est considéré comme un parfait agoniste, stimulant la transcription des gènes cibles, alors que les deux autres œstrogènes ont une action plus faible (Sasson et Notides, 1983b; a) .

Chez la femme, le 17 β -œstradiol est synthétisé principalement dans les ovaires, le cortex surrénalien et le cas échéant le placenta. Sa production suit un rythme cyclique de périodicité mensuelle et ce, de la puberté à la ménopause, sous le contrôle d'hormones peptidiques hypophysaires (LH ou FSH) et hypothalamiques. Elle est soumise à des variations

au cours du cycle menstruel et pendant la grossesse. Chez l'homme, l'épididyme, la prostate et le cerveau sont soupçonnés de synthétiser des œstrogènes (Diel, 2002). Après la ménopause, les ovaires cessent de produire des œstrogènes. La synthèse de E2 s'effectue alors, comme chez l'homme, au niveau des tissus périphériques (foie, os, ...).

Le diéthylstilbestrol (DES) (Tableau 5) est un œstrogène non stéroïdien synthétique (Dodds, 1938). Contrairement au 17β -œstradiol, le DES est une molécule symétrique possédant une flexibilité importante. Le DES exerce une fonction agoniste et une affinité importante vis-à-vis des deux isotypes du récepteur aux œstrogènes (Tableau 6). Son utilisation, il y a quelques dizaines d'années, afin de prévenir les risques d'avortement, s'est avérée être nocive. En effet, il a été montré que les femmes recevant un traitement à base de DES avaient un risque accru de développer un cancer génital. D'autre part, les filles de ces femmes avaient, elles aussi, de plus grande chance de développer un cancer mais pouvaient également présenter des malformations de leurs organes reproducteurs.

Depuis le début des années 1960, des millions de femmes dans le monde utilisent la contraception hormonale pour contrôler leur fertilité. Afin d'augmenter la capacité du progestatif à bloquer l'ovulation, les contraceptifs oraux contiennent un œstrogène. Le 17β -œstradiol s'oxydant très vite en œstrone (E1) après absorption, il a été développé une molécule synthétique : l'éthinylœstradiol (EE2) (Tableau 5).

IV.2 SERM

Les SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) sont des ligands des récepteurs aux œstrogènes présentant une activité mixte agoniste et antagoniste selon le tissu considéré. Il existe différentes façons de classer les SERM, nous avons choisi de les grouper par famille chimique.

La première classe de SERM est la famille des triphényléthylènes dont la molécule de référence est le tamoxifène (Tableau 5). Celui-ci a été le premier médicament oral utilisé dans le traitement des cancers métastatiques du sein dans les années 1970. Depuis, il a été largement utilisé dans la prévention et le traitement des cancers œstrogéno-sensibles. Il diminue significativement le risque de cancer du sein chez la femme pré- et post-ménopausée. Le tamoxifène possède également des effets secondaires positifs : diminution du cholestérol plasmatique et maintien de la densité osseuse. Cependant, l'utilisation du tamoxifène entraîne

l'augmentation des risques de cancer de l'endomètre de trois à quatre fois (Assikis *et al.*, 1996; O'Regan *et al.*, 1998; Southcott, 2001), de cancer du foie ainsi que l'apparition de nombreux autres effets secondaires. Enfin, le taux de résistance à l'action du tamoxifène est assez élevé. D'autres dérivés triphényléthyléniques sont aussi utilisés dans le traitement du cancer du sein : le droloxifène et le idoxifène pour leurs effets anti-œstrogénique et l'absence d'induction d'hépatocarcinomes. Il est aujourd'hui utilisé contre l'infertilité en augmentant la sécrétion de l'hormone de libération de la gonadotrophine (GnRH). Il stimule ainsi la sécrétion de FSH et de LH induisant donc l'ovulation (Goldstein *et al.*, 2000).

La seconde classe de SERM est la famille des benzothiophènes dont la molécule la plus connue est le raloxifène (Tableau 5). C'est la première molécule développée pour agir de façon tissu-spécifique. Il présente les mêmes propriétés que le tamoxifène sans augmenter les risques d'endométriose. Néanmoins, il présente une demi-vie dans le plasma plus courte que le tamoxifène et doit donc être prescrit en plus grande quantité. Il est utilisé comme traitement thérapeutique depuis 1998 et est également administré afin de traiter et de prévenir l'ostéoporose (Kanis *et al.*, 2005). L'arzoxifène est un autre membre de la famille des benzothiophènes qui a été rapporté comme étant un antagoniste de E2 au niveau de la glande mammaire et de l'utérus plus efficace que le tamoxifène et le raloxifène. Des études cliniques ont montré que cette molécule agissait sur le maintien de la densité osseuse et sur la baisse du cholestérol plasmatique chez les patients.

La troisième famille de SERM est celle des dérivés des benzopyrans. Elle regroupe le EM-652 et le EM-800 (Tremblay *et al.*, 1998a). Le EM-652 est le plus puissant SERM développé à ce jour. Il a été démontré qu'à faible dose, il possède la capacité de bloquer la stimulation de ER α par E2 et son efficacité est supérieure à l'ICI 182780. De plus, l'EM-652 agit sur le récepteur en bloquant les deux domaines de *trans*-activation AF-1 et AF-2 (Tremblay *et al.*, 1998a; Tremblay *et al.*, 1998b). Il permet de stopper la croissance des cellules cancéreuses (Dowers *et al.*, 2006).

Tableau 5 : Structures des trois catégories de ligands du récepteur aux œstrogènes humain.

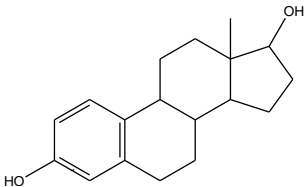
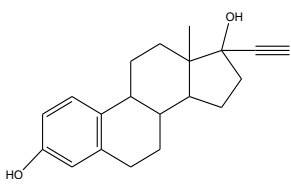
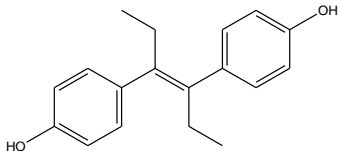
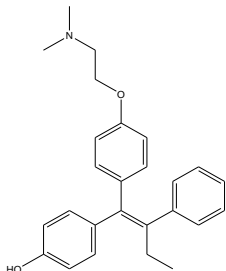
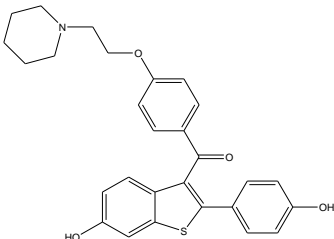
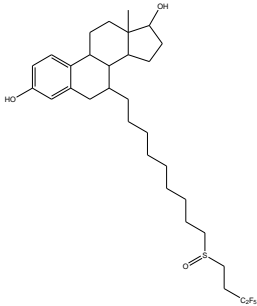
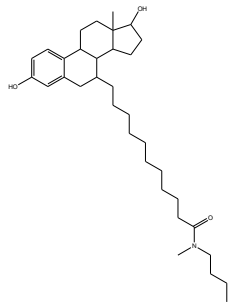
Agonistes purs		
naturel	synthétiques	
17β-œstradiol (E2)	Ethinylœstradiol (EE2)	Diéthylstilbestrol (DES)
		
Agonistes / Antagonistes mixtes		
4-hydroxytamoxifène (4-OHT)	Raloxifène (Ral)	
		
Antagonistes purs		
ICI 182780	ICI 164,384	
		

Tableau 6 : Affinité de certains ligands vis-à-vis des deux isotypes α et β du hER (Zhu *et al.*, 2008).

Ligands	K _D (nM)	
	hERα	hERβ
17β-œstradiol	11,2	8,9
Diéthylstilbestrol	11,2	5,4
Tamoxifène	354,8	251,2
Raloxifène	22,4	63,6
ICI 182780	25,1	25,1

IV.3 Anti-œstrogènes purs

L'ICI 182780 et l'ICI 164,384 (Tableau 5) sont des composés stéroïdiens décrits comme étant des antagonistes « purs » du récepteur aux œstrogènes. Ces deux composés diffèrent entre eux par leur structure et leur affinité vis-à-vis du récepteur aux œstrogènes ainsi que leur efficacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses mammaires. La structure chimique de l'ICI est analogue à celle de E2 : il s'agit d'un œstrogène portant sur le carbone 7 du noyau stérol, une longue chaîne alkylamide ou fluorosulfinyl respectivement pour l'ICI 164,384 et ICI 182780 (Bowler *et al.*, 1989). Des études menées *in vitro*, ont montré que l'ICI 182780 avait une affinité vis-à-vis du ER α inférieure à celle de E2 (Tableau 6) (Wakeling *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 2008). Des études menées *in vivo*, ont montré que ces deux molécules avaient la capacité de bloquer l'action des œstrogènes et des agonistes partiels. En effet, la transcription d'un certain nombre de gènes stimulés par la présence de E2 ou de 4-OHT est bloquée entièrement par l'ajout d'ICI 182780 (Howell *et al.*, 2000). L'affinité avec laquelle l'ICI se fixe sur le récepteur aux œstrogènes est 100 fois supérieure à celle du 4-OHT (Dukes *et al.*, 1992; Dukes *et al.*, 1993). Afin d'expliquer l'effet de ces molécules, des mécanismes ont été suggérés : induction de la protéolyse du ER α , inhibition de la dimérisation et de la liaison à l'ADN, modification du transport nucléo-cytoplasmique du ER et des interactions avec les coactivateurs (Fawell *et al.*, 1990; Wakeling *et al.*, 1991; Arbuckle *et al.*, 1992; Dauvois *et al.*, 1993; Jaber *et al.*, 2006).

V. Protéines associées

En l'absence d'hormone, le récepteur aux œstrogènes est retrouvé sous forme d'hétéro-oligomères associés à un grand nombre de protéines chaperonnes. Ces protéines chaperonnes appartiennent à deux familles de protéines : les protéines de choc thermique Hsp (*Heat shock protein*) et les immunophilines (IP).

V.1 Heat shock proteins : Hsp

Les protéines de choc thermique sont un groupe de protéines de stress hautement conservées et exprimées dans toutes les cellules eucaryotes (Parsell *et al.*, 1993). Les Hsp interagissant avec le récepteur aux œstrogènes sont Hsp90 et Hsp70 ainsi que les co-chaperons Hop (*Hsp70-Hsp90 Organizing Protein*), facteurs pontants entre Hsp70 et Hsp90, et Hip (*Hsp70 Interacting Protein*) (Pratt et Toft, 1997; Richter et Buchner, 2001; Pratt et Toft, 2003). Ces auteurs ont également mis en évidence la présence d'une protéine chaperonne p23 ainsi qu'une immunophiline (Figure 16).

Il a été montré que Hsp90 n'était fonctionnelle que sous forme de dimère et qu'elle interagissait avec le récepteur aux œstrogènes au niveau du domaine de fixation à l'ADN et celui de l'hormone, masquant ainsi les NLS (Renoir *et al.*, 1984; Chambraud *et al.*, 1990; Schlatter *et al.*, 1992). Il a été montré que l'association du récepteur aux œstrogènes avec Hsp90 était capitale pour lui assurer la maturation nécessaire et le maintenir dans un état inactif. En effet, cette association permet de stabiliser la forme native du récepteur aux œstrogènes en maintenant son repliement adéquat et en masquant les résidus aminoacides hydrophobes du LBD afin d'empêcher des interactions non désirées (Pratt et Toft, 1997). Hsp90 aurait aussi un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique du récepteur aux œstrogènes. Certains auteurs ont observé que l'ajout d'inhibiteur de Hsp90 empêche l'import nucléaire des récepteurs stéroïdiens (Kang *et al.*, 1994; DeFranco, 1999). Elle serait également nécessaire pour une activation transcriptionnelle maximale du récepteur (Chambraud *et al.*, 1990; Picard *et al.*, 1990).

Hsp70 est requise pour l'assemblage de l'hétérocomplexe, complexe formé entre les protéines chaperonnes (Hsp et immunophilines) et le récepteur aux œstrogènes, grâce à son activité ATPasique. Elle interagit directement avec Hsp90 et le récepteur aux œstrogènes *via* le LBD. Les interactions mises en jeu dans ce complexe ne sont pas très stables car les techniques biochimiques de purification ne permettent pas de détecter ces protéines associées (Pratt et Toft, 1997; 2003). Hsp70 semble être la première à lier le récepteur. Ensuite, le recrutement ADP-dépendant des protéines Hop et Hip au niveau de Hsp70 est effectué (Figure 16).

Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) et Hip (*Hsp70 interacting protein*) sont des protéines coexistantes au sein de l'hétérocomplexe interagissant avec le récepteur aux œstrogènes. Ces deux protéines se lient avec Hsp70 mais s'y fixent de manière indépendante au niveau de domaines distincts (Gebauer *et al.*, 1997). Contrairement à Hip, Hop possède un second domaine capable d'interagir également avec Hsp90 (Chen *et al.*, 1996), ce lien est essentiel pour le recrutement de Hsp90 au sein du complexe protéique. Ces deux protéines ont également un rôle important dans la stabilisation de l'assemblage (Figure 16) (Chen et Smith, 1998; Johnson *et al.*, 1998).

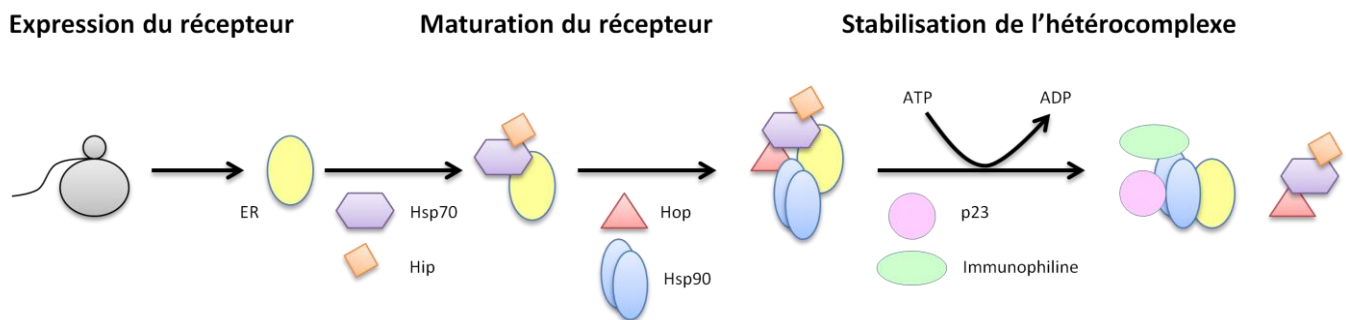


Figure 16 : Etapes de "chaperonnage" du récepteur aux œstrogènes.

Ce mécanisme d'assemblage proposé suit deux étapes. La première étape consiste en le recrutement de protéines chaperonnes indispensables pour faciliter le repliement de la protéine néo-synthétisée. Les interactions mises en jeu entre ER et Hsp70 ne semblent pas être très stables. La seconde étape consiste donc en la stabilisation de l'hétérocomplexe par la fixation de p23 et dans une moindre mesure à la finalisation du repliement de la protéine par les immunophilines. Le récepteur aux œstrogènes est alors dans un hétérocomplexe stable lui permettant de rester dans un état « activable » par le ligand.

V.2 p23

p23 est, comme les protéines de choc thermique, largement retrouvée parmi les espèces eucaryotes, allant de la levure à l'homme. Elle a été identifiée pour la première fois en association avec le récepteur de la progestérone purifié à partir d'oviductes de poules (Smith et Toft, 1992). Il est connu que p23 se fixe directement sur Hsp90 selon un processus nécessitant de l'ATP (Johnson et Toft, 1995; Johnson *et al.*, 1996). Le site de fixation de p23 sur Hsp90 n'a pas encore été identifié mais il semblerait qu'il se situe dans la région N-terminale de la protéine de choc thermique (Grenert *et al.*, 1997; Chadli *et al.*, 2000). Plusieurs travaux ont révélé que, selon les récepteurs, p23 aurait un rôle différent sur les activités cellulaires (Knoblauch et Garabedian, 1999; Freeman *et al.*, 2000). Ainsi, elle

permettrait d'augmenter l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes en facilitant la liaison à l'hormone. Elle aurait également un rôle en tant que stabilisateur de l'hétérocomplexe protéique (voir Figure 16) en absence d'hormone grâce à son interaction avec Hsp90, comme cela a été décrit dans le cas du récepteur à la progestérone (Hutchison *et al.*, 1995).

V.3 Immunophilines

Les immunophilines sont des protéines ubiquitaires et conservées qui lient les immunosuppresseurs tels que FK506, la rapamycine et la cyclosporine A. Tous les membres de cette famille possèdent une activité peptidylprolyl *cis/trans* isomérase (PPIase) suggérant qu'ils jouent un rôle dans le repliement protéique (Schmid, 1993). Ces protéines peuvent se lier à Hsp90 (Owens-Grillo *et al.*, 1996). Les immunophilines peuvent être divisées en deux classes : les FKBP (FKBP52 et FKBP51) et les cyclophilines (CyP40). Ces trois immunophilines peuvent s'associer au récepteur aux œstrogènes. Elles ne coexistent pas dans le même contexte cellulaire et ne peuvent donc être impliquées dans un même hétérocomplexe.

VI. Localisation

VI.1 Localisation nucléaire

Afin d'assurer sa fonction de facteur de transcription, le récepteur aux œstrogènes, une fois traduit dans le cytoplasme, doit se diriger vers le noyau. Au vu de son poids moléculaire, le passage du récepteur à travers l'enveloppe nucléaire est effectué *via* un transport actif. Celui-ci met en jeu les importines présentes au sein des pores nucléaires qui reconnaissent les signaux de localisation nucléaire (NLS) portés par le récepteur. Il a été mis en évidence trois NLS (NLS1-3, Figure 11) dans la séquence du récepteur aux œstrogènes humain. Ils sont localisés dans le domaine de liaison à l'ADN et la région charnière (Picard et Yamamoto, 1987; Picard *et al.*, 1990; Ylikomi *et al.*, 1992). Une délétion successive de ces trois signaux induit une diminution graduelle de l'accumulation du récepteur dans le noyau, suggérant une

coopérativité de ces trois séquences dans le transport du récepteur. Il existe un quatrième NLS situé dans le domaine de fixation à l'hormone qui est démasqué lors de la fixation du ligand et qui agit en coopération avec les trois autres NLS décrits précédemment. Il a été montré que le récepteur aux œstrogènes, comme celui de la progestérone, importé par transport actif dans le noyau diffusait de manière permanente vers le cytoplasme (Dauvois *et al.*, 1993; Guiochon-Mantel *et al.*, 1996; DeFranco, 1999; Hager *et al.*, 2000).

Jusqu'au début des années 1980, le modèle classique d'action des récepteurs aux hormones stéroïdiennes proposait que les récepteurs étaient exclusivement cytoplasmiques en l'absence de ligand et n'étaient dirigés vers le noyau qu'en présence de celui-ci (Gorski *et al.*, 1968; Jensen *et al.*, 1968). Il est clair aujourd'hui que l'isotype α du récepteur aux œstrogènes est exclusivement nucléaire et cette localisation est indépendante de la présence de l'hormone (King et Greene, 1984; Welshons *et al.*, 1984). Il a été montré que le hER β était retrouvé dans les mitochondries des cellules (O'Lone *et al.*, 2007). Le développement de techniques de marquage des récepteurs par des protéines fluorescentes, notamment la GFP (*Green Fluorescent Protein*), et l'utilisation de la microscopie confocale, ont permis de confirmer cette hypothèse et d'apporter des précisions sur cette localisation. Il a été montré qu'en absence de ligand, l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain fusionné à la GFP était diffus dans tout le noyau à l'exception des nucléoles dans cellules cancéreuse mammaires (MCF-7) ou des cellules COS ou Hela (Htun *et al.*, 1999; Stenoien *et al.*, 2000a; Stenoien *et al.*, 2000b; Yoshida *et al.*, 2002). L'ajout de ligands (E2, 4-OHT ou ICI 182780) provoque une redistribution intranucléaire qui se traduit par l'apparition de spots fluorescents, ou *foci*, de GFPHER α dans le noyau (Htun *et al.*, 1999). Ceci laisse supposer que le récepteur non ligandé ne se déplace pas librement mais serait lié à la matrice nucléaire ; l'addition de ligand produit alors une interaction plus forte du récepteur à la matrice nucléaire dans un laps de temps très court (10 min) (Stenoien *et al.*, 2000a). Il a également été montré par ces mêmes auteurs une colocalisation du GFPHER α , du cofacteur SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*) ainsi que de l'ARN polymérase II. Ces résultats suggèrent que la réorganisation intranucléaire de GFPHER α est associée aux mécanismes transcriptionnels (Stenoien *et al.*, 2000a). Des expériences de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont également mis en évidence cette association mais aussi que le GFPHER α et SRC-1 présentaient une mobilité intranucléaire plus grande en l'absence de ligands (E2 ou 4-OHT) qu'en leur présence (Stenoien *et al.*, 2001).

Une étude récente menée par Matsuda et collaborateurs menée sur des cellules COS-1 a montré que la localisation des récepteurs aux œstrogènes humains étaient identiques pour les isotypes α et β : localisation du récepteur fusionné à la GFP exclusivement nucléaire et formation de *foci* fluorescents après addition de E2 (Matsuda *et al.*, 2002). Ils ont aussi montré que les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain, exprimés dans la même cellule et fusionnés à la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) pour l'un et à la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) pour l'autre, colocalisent parfaitement. D'autre part, l'utilisation de mutants délétés de certains domaines du récepteur aux œstrogènes a permis de mettre en évidence que la translocation du récepteur dans le noyau nécessitait la présence du domaine E/F et que la relocalisation intranucléaire impliquait quasiment tous les domaines du récepteur. Toutefois, la présence d'un seul domaine AF-1 ou d'un seul DBD au sein de l'homo- ou de l'hétérodimère suffit pour observer la formation de *foci* (Matsuda *et al.*, 2002).

VI.2 Localisation membranaire

A la fin des années 1970, il a été observé, sur des cellules endométriales et des cellules hépatiques que l'ajout d'œstradiol induisait des réponses physiologiques trop rapides (de l'ordre de quelques secondes à la minute) pour que les récepteurs nucléaires soient impliqués. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un récepteur aux œstrogènes ancrés dans la membrane plasmique (Pietras et Szego, 1977; 1980). Afin de confirmer cette hypothèse, certaines équipes ont utilisé une molécule chimérique E2-BSA incapable de passer à travers la membrane plasmique. Les effets obtenus sont similaires à ceux observés pour E2 (Stefano *et al.*, 1999; Chaban *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004). D'autre part, Pappas et collaborateurs ont observé dans les cellules hypophysaires de rat une colocalisation, au niveau de la membrane plasmique, de la fluorescence émise par un anticorps spécifique du ER α nucléaire et de la FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate) liée à E2-BSA (Pappas *et al.*, 1995). Ces expériences réalisées en présence d'ICI 182780, un antagoniste pur du récepteur aux œstrogènes, ont montré un blocage de l'effet produit par E2-BSA. Watson et collaborateurs ont également mis en évidence dans des cellules tumorales d'hypophyse de rat, exprimant une plus grande quantité de récepteurs aux œstrogènes, l'existence d'un récepteur membranaire par l'utilisation de 9 anticorps reconnaissant différents épitopes de ER α (Norfleet *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1999).

A ce jour, ce récepteur membranaire n'a pas été caractérisé ou isolé. Cependant plusieurs hypothèses ont été émises quant à son identification :

1. Le récepteur membranaire consisterait en un **ancrage du ER α ou ER β nucléaire dans la membrane plasmique**. En effet, la reconnaissance du récepteur membranaire par différents anticorps spécifiques du ER α ainsi que l'inhibition provoquée par l'ICI suggèrent fortement que les ER membranaires et nucléaires sont identiques. Ne contenant pas de domaine transmembranaire, la capacité du récepteur à s'associer à la membrane doit être due à une addition post-traductionnelle de lipides (palmitoylation, myristoylation) (Acconcia *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2005; Marino et Ascenzi, 2008) et/ou une interaction avec des protéines membranaires spécifiques comme la calvéoline-1 (Kim *et al.*, 1999; Schlegel *et al.*, 2001; Evinger et Levin, 2005) ou des récepteurs des facteurs de croissance transmembranaires tels que IGFR-I (*Insulin-like Growth Factor Receptor I*) et EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Pietras et Marquez-Garban, 2007).
2. Le récepteur membranaire résulterait d'un **épissage alternatif du gène** codant pour ER α ou ER β . Bender et collaborateurs ont observé la présence d'un récepteur tronqué, de poids moléculaire apparent de 46kDa, dans la membrane plasmique de cellules endothéliales humaines (Li *et al.*, 2003). Il s'agit du même récepteur découvert par l'équipe de Pakdel dans les cellules mammaires cancéreuses de la lignée MCF-7 (Flouriot *et al.*, 1996).
3. Le récepteur membranaire serait une **protéine différente de ER α et ER β** . Cette hypothèse a été formulée car certaines équipes, en cherchant à caractériser le récepteur membranaire n'ont observé aucun effet de l'ICI sur les réponses engendrées par E2 (Singh *et al.*, 2000). Certains auteurs émettent l'hypothèse que des protéines membranaires comme les protéines G et plus particulièrement GPR30 (*G Protein-coupled Receptor 30*) joueraient le rôle de récepteurs aux œstrogènes membranaires. En effet, GPR30 fixerait E2 et induirait des réponses non génomiques telles que la régulation des flux de calcium ou l'activation des canaux potassiques (Filardo, 2002; Thomas *et al.*, 2005). Récemment un récepteur à la progestérone membranaire présentant une structure et une fonctionnalité similaire aux GPR a été identifié (Hammes, 2003; Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b). L'existence d'un ER-X a également été publiée. Ce récepteur, retrouvé dans la membrane plasmique de cellules utérines ou de cerveau de souris diffère de ER α et ER β par son affinité pour les ligands (Toran-Allerand *et al.*, 2002). D'autre part, alors que ER α et ER β s'associent avec Hsp90 pour les maintenir dans un état inactif, l'association de ER-X à Hsp90 est indispensable

pour que la voie des MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) soit activée (Toran-Allerand *et al.*, 2002).

VII. Modification post-traductionnelle : la phosphorylation

Les modifications post-traductionnelles sont des modifications réversibles qui contribuent largement à l'activité des récepteurs aux œstrogènes *in vivo*, en contrôlant de multiples fonctions telles que les interactions protéine-protéine, la liaison à l'ADN, l'activation de la transcription ainsi que les mécanismes de dégradation de la protéine par le protéasome. En effet, l'ajout de groupements phosphate, acétyle ou glycosyle peuvent induire des changements conformationnels pouvant potentiellement moduler l'activité du récepteur. Dans cette section, nous allons plus particulièrement nous intéresser à la phosphorylation.

VII.1 Phosphorylation de hER α

Les différents sites de phosphorylation de l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain ont été identifiés par délétions et mutations et sont localisés de la manière suivante : S104, S106, S118 et S167 sont retrouvés dans le domaine A/B, S236 est présent dans le domaine de fixation de l'ADN et S305 et T311 sont des résidus aminoacides de la région charnière et Y537 est situé dans le domaine de liaison à l'hormone (Figure 17, Tableau 7) (Le Goff *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1999).

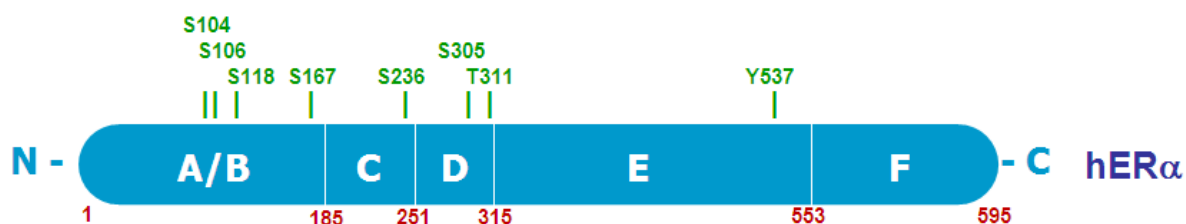


Figure 17 : Localisation et nature des sites de phosphorylation identifiés au sein de la structure primaire du hER α .

La position et la nature des sites de phosphorylation identifiés par délétions et mutations dans la structure primaire du hER α sont indiquées sur le schéma en vert. Les chiffres rouges représentent la numérotation en résidus aminoacides dans la séquence.

La phosphorylation du résidu S118 est la plus largement étudiée car ce résidu est hautement conservé et, il a été montré, *in vivo* sur des cellules COS-1 transfectées par un plasmide exprimant ER α et des cellules MCF-7, que S118 était significativement phosphorylé en présence d'œstrogènes (Joel *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002; Lannigan, 2003) ou de facteurs de croissance (Joel *et al.*, 1998a; Joel *et al.*, 1998b; Murphy *et al.*, 2006) (Tableau 7). La phosphorylation de S118 de hER α est également induite *in vivo* par le 4-hydroxytamoxifène mais à un niveau beaucoup faible (environ 6 fois) que E2. La présence d'ICI 182780, quant à elle, n'a aucun effet (Chen *et al.*, 2002). hER α peut être directement phosphorylé *in vitro* sur S118 par un enzyme de la voie des MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Kato *et al.*, 1995a). De plus, *in vivo*, plusieurs études ont montré que l'activation de la voie Ras-Raf-ERK1/2 (MAPK) conduisait à une phosphorylation majeure du récepteur aux œstrogènes sur le résidu S118 et ce processus peut être ligand-indépendant (Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996; Migliaccio *et al.*, 1996; Joel *et al.*, 1998b). Plusieurs autres kinases responsables de la phosphorylation de ce résidu ont été décrites (Tableau 7). Ainsi, en réponse à la fixation de E2 sur hER α , S118 serait phosphorylé par Cdk7 (*Cyclin-dependent kinase 7*) qui nécessiterait une interaction avec TFIIH (*Transcription Factor II H*) au niveau du domaine AF-2 du récepteur aux œstrogènes (Chen *et al.*, 2000b). Deux autres kinases potentielles ont été décrites dans la littérature : il s'agit de GSK3 (*Glycogen Synthase 3 Kinase*) et de IKK α (*IKappaB Kinases alpha*) (Medunjanin *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). La phosphorylation de S118 influence plusieurs fonctions de hER α (Tableau 7). En effet, la substitution de ce résidu par un résidu alanine ou bien l'utilisation d'inhibiteur de kinases affecte considérablement l'activité transcriptionnelle du récepteur ainsi que sa dimérisation et par conséquent sa liaison à l'ADN. En revanche, la substitution de S118 par un résidu glutamate (E) (mimant une phosphorylation constitutive) ou l'utilisation de kinases (protéines purifiées pour les tests *in vitro* ou vecteurs d'expression contenant le gène codant pour une protéine kinase pour les expériences menées *in vivo* dans les cellules COS-1 ou encore Hela) augmente la *trans*-activation du récepteur (Ali *et al.*, 1993; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996; Joel *et al.*, 1998b; Endoh *et al.*, 1999; Dutertre et Smith, 2003; Lannigan, 2003; Thomas *et al.*, 2008). L'activation de la voie AMPc produit une augmentation de la phosphorylation globale du récepteur aux œstrogènes et notamment de la phosphorylation de S118 (Ali *et al.*, 1993; Aronica *et al.*, 1994; Joel *et al.*, 1995), et induit également une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur en présence de E2 (Cho et Katzenellenbogen, 1993). D'autre part, le recrutement de coactivateurs, tels que ceux de la

famille SRC (voir § VIII.1.2.3), est aussi influencé par la phosphorylation du résidu S118 (Chen *et al.*, 2000a; Dutertre et Smith, 2003). Endoh et collaborateurs ont montré qu'en présence de E2, la phosphorylation de S118 était liée au recrutement de l'ARN hélicase p68, coactivateur interagissant avec la fonction AF-1 du domaine A/B (Endoh *et al.*, 1999). Il a également été montré que S118 pouvait être phosphorylé par le biais de la voie des MAPKs en absence de E2 mais en réponse aux facteurs de croissance : EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*) ou TGF α (*Transforming Growth Factor*) (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996).

Tableau 7 : Sites de phosphorylation, kinases potentielles et rôle de la phosphorylation dans la fonction de hER α .

Résidus	Domaine	Phosphorylation en réponse à	Kinases potentielles	Effet de la phosphorylation sur la fonction du récepteur (activation et inhibition)
S104 S106	A/B	E2	Cdk2 / cycline A ; ERK1/2 ; GSK3 β	- Activité cellulaire - Dimérisation - Recrutement de coactivateurs
S118	A/B	E2, 4-OHT Ras activé EGF / IGF / TGF α	Cdk7 / TFIIH ; ERK 1/2 ; GSK3 β ; IKK α	- Activité cellulaire - Dimérisation - Recrutement de coactivateurs
S167	A/B	E2, EGF	pp90rsk1/2 ; casein kinase II ; PI3K/Akt	- Liaison à l'ADN - Activité cellulaire
S236	C	AMPc	PKA	- Dimérisation en absence de ligands - Fixation à l'ADN en absence de ligands
S305	D	E2 AMPc	PKA ; PAK-1	- Dimérisation - Activité cellulaire constitutive en absence de ligand
T311	E	E2	p38MAPK	- Localisation nucléaire
Y537	E		p60 ^{c-src} ; p56 ^{lck}	- Activité cellulaire constitutive en absence de ligand - Recrutement de coactivateurs

Le domaine de *trans*-activation indépendante de la présence de l'hormone (domaine A/B contenant la fonction AF-1) présente trois autres résidus sérine phosphorylés : S104/S106 et S167 (Figure 17, Tableau 7). La phosphorylation des résidus S104 et S106 est abondamment décrite dans la littérature. Le résidu S106, hautement conservé entre les espèces, est phosphorylé en réponse à E2, et sa phosphorylation s'accompagne de celle de S104. La phosphorylation des résidus S104/106 est impliquée dans l'activité transcriptionnelle, la dimérisation et le recrutement de coactivateurs (Dutertre et Smith, 2003; Lannigan, 2003; Thomas *et al.*, 2008). Ces deux résidus seraient phosphorylés par la même protéine kinase et leur phosphorylation serait dépendante du type de cellules (Castano *et al.*, 1998). Plusieurs protéines kinases ont été identifiées *in vivo* et *in vitro*. Trowbridge et

collaborateurs ont observé que l'activation et l'inhibition de la Cdk2/cycline A modulent l'activité transcriptionnelle de ER α dans 3 lignées cellulaires : cellules Hela, cellules mammaires normales et cellules d'ostéosarcomes (Trowbridge *et al.*, 1997). Par des techniques de mutagenèse et de phosphorylation *in vitro*, les résidus S104 et S106 de hER α ont été identifiés comme les cibles de Cdk2/cycline A (Rogatsky *et al.*, 1999). Medunjanin et collaborateurs ont mis en évidence, *in vivo* et *in vitro*, que GSK3 β (*Glycogen Synthase 3 Kinase beta*) est responsable de la phosphorylation de S104 et S106 en présence de E2 (Medunjanin *et al.*, 2005). ERK1/2 serait également responsable de la phosphorylation de ces résidus (Thomas *et al.*, 2008).

Il a été rapporté que S167 est également un site majoritairement phosphorylé à la suite de la liaison à E2 (Arnold *et al.*, 1994). Il est aussi phosphorylé en réponse à l'activation de la voie des MAPKs (Joel *et al.*, 1998a). Des études menées *in vivo* et *in vitro* ont montré que la pp90rsk 1 et 2 (*p90 ribosomal S6 kinase 1*) pouvait phosphoryler S167 (Joel *et al.*, 1998a; Clark *et al.*, 2001). Ce résidu peut également être phosphorylé, *in vitro* en présence d'hormone, par la caséine kinase II et le couple PI3K (PhosphoInositol-3 Kinase) / Akt (ou Protéine Kinase B) (Arnold *et al.*, 1995b; Martin *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001). Le couple PI3K/Akt serait lui-même activé par une Src kinase (Shah et Rowan, 2005). Par rapport au ER sauvage, le mutant S167A possède la même capacité à fixer les ligands mais une forte diminution de celle à se lier à ses ERE et d'où une forte baisse de l'activité transcriptionnelle (Castano *et al.*, 1997; Joel *et al.*, 1998a; Clark *et al.*, 2001).

Le résidu S236 est localisé dans le domaine C et sans surprise, sa phosphorylation joue un rôle dans la fixation à l'ADN (Figure 17, Tableau 7). Contrairement à S167, la phosphorylation de S236, catalysée par PKA (*cyclin-AMP dependent protein kinase* ou Protéine Kinase A), en absence de ligands, inhibe la dimérisation du récepteur aux œstrogènes et donc potentiellement sa fixation à l'ADN (Chen *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2004).

Le résidu Y537 est le seul résidu du domaine de fixation de l'hormone et le seul résidu tyrosine phosphorylé de hER α (Figure 17, Tableau 7). Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les kinases responsables de sa phosphorylation font partie de la famille Src : p60^{c-src} et p56^{lck} (Arnold *et al.*, 1995a; Arnold *et al.*, 1997). Les mutants Y537A et Y537S présentent une activité transcriptionnelle constitutive et une association avec des coactivateurs en absence d'hormone (Weis *et al.*, 1996; Lazennec *et al.*, 1997; Zhang *et al.*,

1997). Ces auteurs suggèrent que Y537 est situé dans une région prépondérante pour les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle hormono-dépendante du récepteur. Aussi, une seconde hypothèse est émise : la substitution de Y537 par certains résidus aminoacides faciliterait le déplacement de l'hélice H12 dans une conformation induisant une activité transcriptionnelle constitutive indépendante du ligand. Ceci pourrait conduire à une stabilisation du récepteur sous sa forme active (Lazennec *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Yudt *et al.*, 1999). Des études de mutagénèse dirigée ont montré que la phosphorylation de ce résidu est nécessaire pour qu'il y ait interaction entre le récepteur et le coactivateur SRC-1 en présence de ligand (White *et al.*, 1997). Enfin, la phosphorylation de Y537 faciliterait également celle des résidus sérine par un mécanisme de « phosphorylation en chaîne » (Arnold *et al.*, 1995c).

Il a été montré que la phosphorylation du résidu T311 contrôlerait la localisation nucléaire de hER α (Figure 17, Tableau 7) (Lee et Bai, 2002). En effet, au niveau de la séquence peptidique, T311 est très proche d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et d'un signal d'export nucléaire (NES) putatif du hER α . La p38MAPK, activée en présence d'œstradiol, phosphoryle le résidu T311. Cela a pour conséquence le piégeage du hER α dans le noyau de la cellule. Ces résultats ont été obtenus seulement pour des cellules d'Ishikawa (cellules d'adénocarcinomes endométriaux).

Les kinases responsables de la phosphorylation du résidu S305 sont PKA et Pak1 (*p21-activated kinase 1*) (Figure 17, Tableau 7) (Michalides *et al.*, 2004; Rayala *et al.*, 2006). Les effets de cette phosphorylation ne sont pas entièrement connus. Toutefois, il a été montré que la dimérisation du mutant S305E en présence d'E2 était significativement plus efficace que celle du ER sauvage. De plus, en absence de ligand le mutant S305E a une capacité plus grande à se fixer à l'ADN (Tharakan *et al.*, 2008). Il a été montré que la phosphorylation de S305 induit une activité transcriptionnelle constitutive du récepteur aux œstrogènes en absence de ligand (Wang *et al.*, 2002; Balasenthil *et al.*, 2004) et que celle-ci induisait la phosphorylation de S118 (Rayala *et al.*, 2006). D'autre part, la phosphorylation de S305 permet au 4-OHT d'agir comme un agoniste à part entière (Michalides *et al.*, 2004; Holm *et al.*, 2009). Il est suggéré que la phosphorylation de S305 induise un changement de conformation idéal pour la phosphorylation de S118. Il en découle alors une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ER (Tharakan *et al.*, 2008). La phosphorylation de ce résidu pourrait être à la base de la résistance de certaines tumeurs mammaires au tamoxifène.

VII.2 Phosphorylation de hER β

Tous les sites de phosphorylation du hER β n'ont pas été identifiés. Néanmoins, il a été montré que la phosphorylation des résidus S87 (homologue de S118 chez hER α , voir Figure 18) et S105 (homologue d'un résidu sérine non phosphorylé de l'isotype α) augmente l'interaction de hER β avec des coactivateurs et que les kinases responsables de leur modification seraient des MAPKs (Tremblay *et al.*, 1999). Nous pouvons supposer que les effets de la phosphorylation de S87 (hER α S118) et Y488 (hER α Y537) sur la fonctionnalité de l'isotype α soient identiques à ceux sur l'isotype β . En effet, la substitution du résidu tyrosine du hER β de souris par un résidu asparagine induit une activité transcriptionnelle constitutive du récepteur comme ce qui a été observé pour l'isotype α humain (Tremblay *et al.*, 1998b). L'alignement de séquence avec hER α suggère que les résidus S75, S135 et S200 seraient susceptibles d'être phosphorylés (Figure 18) (Ascenzi *et al.*, 2006). Le résidu T311 phosphorylé chez hER α n'est pas conservé chez hER β . Néanmoins, hER β possède en position 264 un résidu sérine suivi d'un résidu proline. Ce résidu S264 est donc un substrat potentiel de sérine/thréonine kinase.

Domaine A/B									
hER α	101	NSV	SP	SPLML	LHPPPQL	SPF	LQPHGQQVPY	YLENEPSGYT	140
hER β	72	--QT	TSPNVL	WPTPGHL	SP--	LVVHRQLSHL	YAE	PQKSPWC	108
hER α	151	RPNSDNRRQG	GRERLASTND	170					
hER β	119	VNRETLKRKV	SGNRCASP--	136					
Domaine C					Domaine D				
hER α	231	KNRRK	SCQAC	240	hER α	301	SKKNS	LALSL	TADQMVSALL DAEPPILYSE 330
hER β	195	KNRRK	SCQAC	204	hER β	254	RVRELLLDAL	SPEQLVLTLL	EAEPHVLIS 283
Domaine E/F									
hER α	531	KNVVPLY	DLL	540					
hER β	482	KNVVPVY	DLL	491					

Figure 18 : Alignement des séquences en résidus aminoacides des deux isotypes des récepteurs aux œstrogènes humains.

Ici ne sont représentées que les séquences comportant des sites identifiés (surlignage jaune) ou potentiels (surlignage gris) des deux ER.

VIII. Mécanismes d'action du récepteur aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes peuvent agir selon deux mécanismes différents. Le premier permet de réguler la transcription des gènes cibles par le biais de la fixation du récepteur intracellulaire à son élément de réponse aux œstrogènes (ERE) au sein du promoteur de gènes cibles ou par des interactions protéines-protéines ; ce mécanisme est communément appelé mécanisme génomique. Il existe 3 voies de signalisation génomique : classique, ERE-indépendante et ligand-indépendante (Figure 19). Le second mécanisme est non-génomique. Les stéroïdes, agissant par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, entraînent une cascade de réaction dont des phosphorylations et modulent des fonctions physiologiques rapides telle que la régulation du flux calcique.

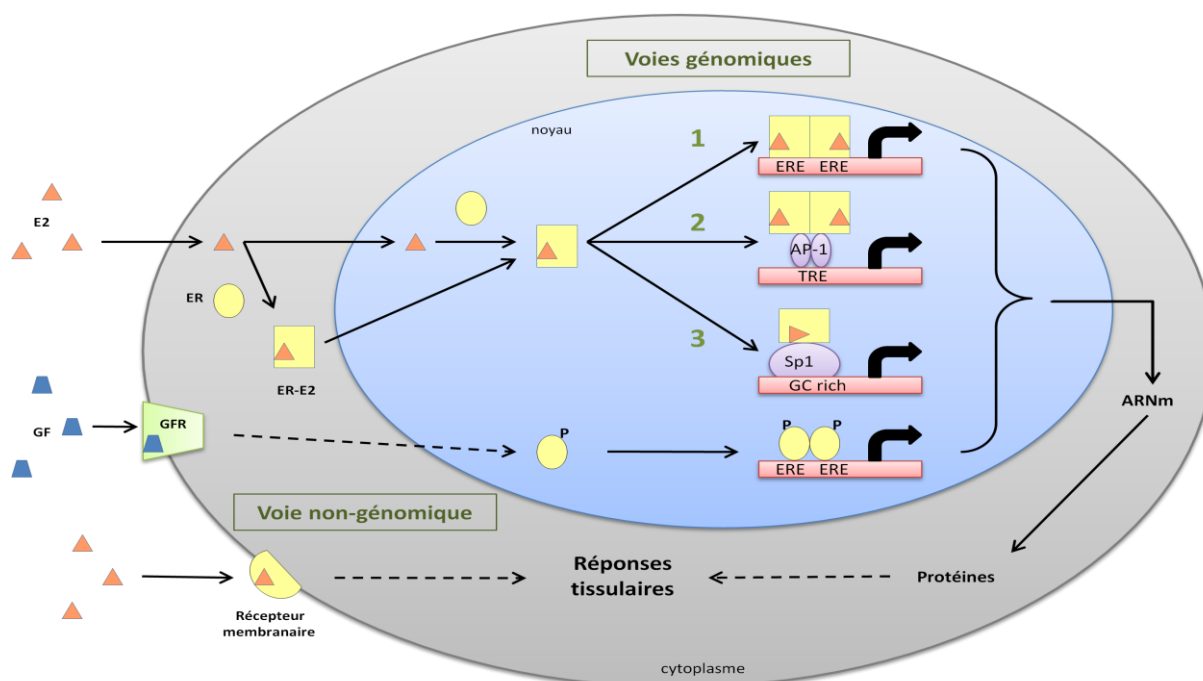


Figure 19 : Les différentes voies de signalisation cellulaire de l'œstradiol et de son récepteur.

La voie 1 est la voie de signalisation génomique classique ligand- et ERE-dépendants. Le ER ligandé à E2 se lie sous forme dimérique à une séquence ERE spécifique, recrute les corégulateurs et la machinerie transcriptionnelle et active ainsi la transcription du gène cible. La localisation cytoplasmique ou nucléaire de la formation du complexe ER-E2 n'est pas encore très claire. Les voies 2 et 3 font intervenir un mécanisme ERE-indépendant. Les complexes ER-E2 peuvent induire la transcription de gènes en se liant à des protéines spécifiques Sp1 ou AP-1 (formé des protéines c-Fos et c-Jun) liées respectivement à des domaines nucléotidiques riches en glutamine ou TRE (*TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) Response Element*). La 4^{ème} voie de signalisation génomique est ligand-indépendante. Les facteurs de croissance (GF) ou l'AMPc (non montré) active une cascade de kinases induisant la phosphorylation (P) du ER. Le récepteur phosphorylé peut ainsi de lier à ses ERE sans fixation préalable de ligands. La séquestration du ER non ligandé au sein de complexe transitoire formé par les protéines chaperonnes ainsi que l'intervention des corégulateurs et des facteurs de transcription est décrite dans la suite du manuscrit.

VIII.1 Action génomique

Le rôle principal des œstrogènes est de réguler l'expression de gènes cibles spécifiques par l'intermédiaire de leur récepteur. Le mécanisme classique, détaillé ci-dessous, de l'activation génomique des récepteurs des hormones stéroïdes se manifeste par une série d'évènements séquentiels comme ce qui est schématisé sur la Figure 19.

VIII.1.1 Mécanisme de la voie de signalisation génomique classique

Lorsque le récepteur aux œstrogènes se trouve à l'état libre dans la cellule, il est retrouvé au sein d'un hétérocomplexe (ou complexe transitoire) formé par les protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique (Hsp, *Heat shock protein*), de la protéine chaperonne p23 et d'immunophilines (Ylikomi *et al.*, 1998). Après liaison du ligand, il se dissocie de ce complexe et se dimérise. ER α et ER β ligandés interagissent spécifiquement avec des séquences d'ADN appelées ERE en tant qu'homo- ou hétérodimère (Tsai et O'Malley, 1994; Hall et McDonnell, 1999). Cela entraîne le recrutement des coactivateurs (Bourguet *et al.*, 2000) et des facteurs de transcription sur les régions promotrices initiant ainsi l'activation de l'ARN polymérase II et la synthèse de nouveaux ARNm (Figure 20).

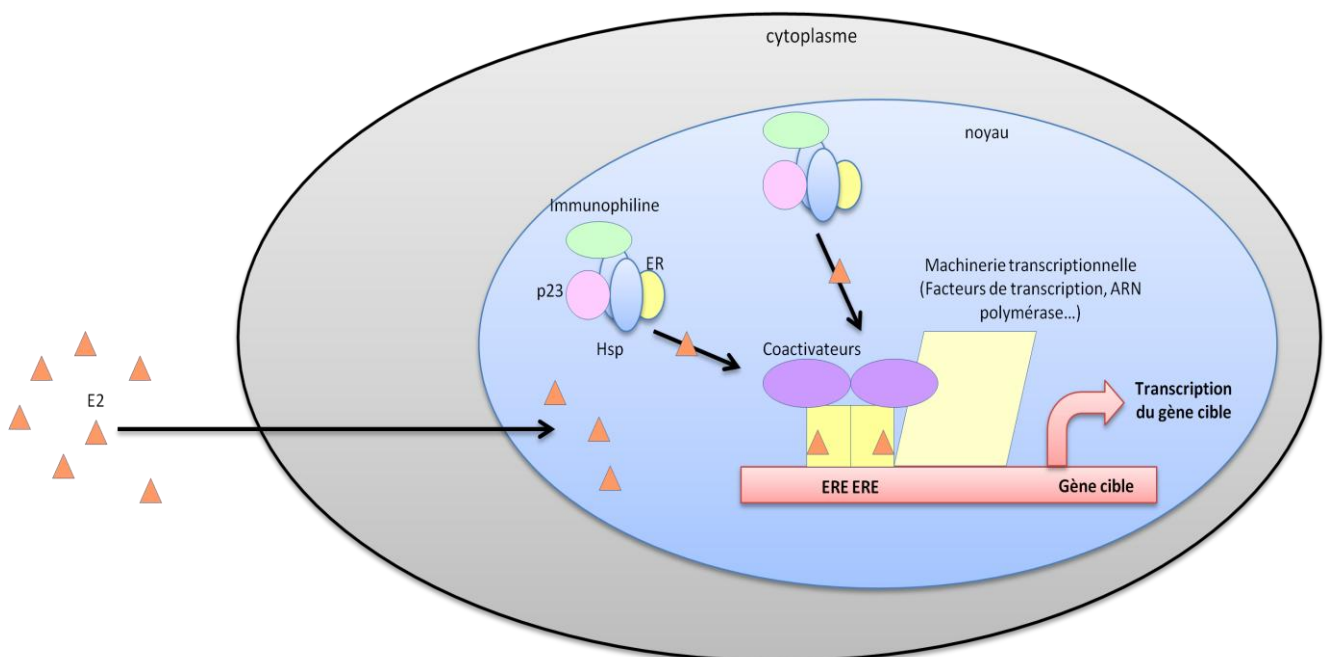


Figure 20 : Modèle classique d'action du récepteur aux œstrogènes.

Après liaison aux ERE, l'activité transcriptionnelle de hER est exprimée par deux fonctions de *trans*-activation. La fonction AF-2, localisée dans le domaine E, est relativement bien conservée entre les deux isotypes du hER alors que AF-1, située dans le domaine A/B est faiblement conservée, aussi bien au niveau de la séquence que de la fonction (Hall et McDonnell, 1999).

De nombreuses protéines corégulatrices (coactivateurs ou corépresseurs) sont impliquées dans la répression ou l'activation des gènes cibles. Ces cofacteurs ne pouvant pas lier l'ADN directement, s'associent aux récepteurs aux œstrogènes liés au niveau des régions promotrices des gènes cibles et affectent ainsi leur taux de transcription (Horwitz *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 1999a; McKenna *et al.*, 1999b; Xu *et al.*, 1999; Glass et Rosenfeld, 2000). La régulation transcriptionnelle est également médiée par la modification de la structure chromatinienne. La chromatine ouverte (euchromatine) facilite l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle basale et stimule le taux de transcription. Par contre, la structure hautement conservée de la chromatine (hétérochromatine) empêche la fixation de la TBP (*TATA-Binding Protein*, protéine qui, en se fixant sur la séquence TATAAA située dans le promoteur des gènes, induit la fixation des autres facteurs de transcription et de l'ARN polymérase pour former le complexe de pré-initiation de la transcription) et réprime la transcription. La structure de la chromatine peut être altérée par la modification covalente des histones du nucléosome. L'acétylation de certaines lysines des histones diminue les interactions entre l'ADN et le nucléosome, en diminuant la charge nette positive des histones (l'ADN étant chargé négativement). Ce phénomène est réversible et implique une activité enzymatique de déacétylation. Les deux activités d'histone acétyl-transférase (HAT) et histone déacétylase (HDAC) sont respectivement associées aux coactivateurs et aux corépresseurs, procurant un lien enzymatique aux mécanismes d'activation et de répression transcriptionnelle par les récepteurs aux œstrogènes.

VIII.1.2 Acteurs intervenant dans le mécanisme génomique classique

VIII.1.2.1 Eléments de réponse aux œstrogènes (ERE)

Le récepteur aux œstrogènes agit sur ses gènes cibles par la reconnaissance et l'association à une séquence nucléotidique spécifique appelée Elément de Réponse aux Œstrogènes (ERE). La première séquence ERE a été observée dans la région promotrice du gène codant la vitellogénine A2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique de 13 paires de bases composée de deux demi-sites inversés répétés de 5 pb séparés par 3 pb : 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Tableau 8) (Klein-Hitpass *et al.*, 1986). Récemment, il a été montré que les nucléotides flanquant cette séquence étaient importants et que l'ERE minimal devait être considéré comme une séquence de 15 pb dont le consensus est : 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' (Klinge *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1998).

Tableau 8 : Gènes régulés par les récepteurs aux œstrogènes et leur séquence ERE (liste non exhaustive).

Les séquences palindromiques sont soulignées.

Gène	Espèce	Séquence ERE
Vitellogénine A2	Xénope	5' GTCAGGTCACAGTGACCTGAT 3'
Vitellogénine A2	Poulet	5' GTCAGGTCACAGTGACCTGAT 3'
Récepteur aux œstrogènes	Humain	5' TGGTCAGGCTGGTC(N ₉) 3'
Lactoferrine	Humain	5' AGCAGGTCAAGGCGATCTGTA 3'
Récepteur à la progestérone	Humain	5' AAGGGCAGGAGCTGACCAGCG 3'
<i>c-fos</i>	Humain	5' GAGCCGGCAGCGTGACCCGG 3'
pS2	Humain	5' GCAAGGTCACGGTGGCCACCC 3'

Les éléments de réponse des récepteurs aux hormones stéroïdiennes possèdent des séquences nucléotidiques fortement homologues. En effet, les nucléotides en position 1, 2 et 5 (Figure 21) sont conservés alors que ceux aux positions 3, 4 et 6 diffèrent et sont à la base de la discrimination entre les ERE et les éléments de réponse des autres récepteurs aux hormones stéroïdiennes (en particulier des récepteurs aux glucocorticoïdes GR, progestérone PR et aux androgènes AR) (Klinge, 2001).

	5'												3'
Nucléotides	A	G	G	T	C	A	n n n	T	G	A	C	C	T
Position	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6

Figure 21 : Séquence ERE consensus et position des bases nucléotidiques.

Le récepteur aux œstrogènes se fixe sur ses ERE sous forme dimérique (Sasson et Notides, 1984; Skafar et Notides, 1985). Les interactions spécifiques entre le dimère de récepteur aux œstrogènes et le squelette sucre-phosphate de l'ERE sont importantes d'une part dans l'accessibilité et la reconnaissance de la séquence, et d'autre part dans l'affinité de l'association (Koszewski et Notides, 1991). Chaque monomère fixe un demi-motif de l'ERE au niveau du grand sillon de l'ADN, le dimère étant localisé principalement sur un même côté de la double hélice (Koszewski et Notides, 1991). Trois acides aminés de la P-box du premier doigt CI interagissent avec le grand sillon de façon spécifique (Mader *et al.*, 1989). Le second doigt de zinc CII est impliqué dans la reconnaissance de l'espacement entre les deux demi-sites et dans la dimérisation du récepteur aux œstrogènes (Martinez et Wahli, 1989). Cet espacement a été montré comme étant une condition *sine qua non* de l'interaction entre le récepteur et l'ERE (Anolik *et al.*, 1995).

Les effets de la fixation du récepteur aux œstrogènes sur les ERE sont divers. Nardulli et collaborateurs ont démontré que cette interaction provoquait une courbure du fragment d'ADN contenant l'ERE au niveau du grand sillon de la double hélice : 56° pour ERα (environ 54° pour ERβ) et 34° pour le DBD seul. Cette valeur est augmentée en présence de 2 ERE (67°) (Nardulli et Shapiro, 1992; Nardulli *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 2003). Ceci suggère l'implication des autres régions du récepteur dans ce processus.

A ce jour, beaucoup de gènes œstrogéno-dépendants ont été identifiés et la plupart d'entre eux ne portent pas d'ERE consensus mais une séquence dite « imparfaite » non palindromique. D'autres types de séquence peuvent être reconnus par le récepteur aux œstrogènes : séquence répétée directe AGGTCA_(>10pb)AGGTCA (Kato *et al.*, 1995b), séquence opposée répétée TGACCTnnnAGGTCA (Kuntz et Shapiro, 1997), des demi-sites enrichis en AT ou encore un variant de la séquence *Alu* contenant un ERE imparfait ainsi qu'un demi-site situé 9 pb en amont (Klinge, 2001). Les conséquences de la dégénérescence des ERE sont une affinité plus faible du récepteur aux œstrogènes, une activation de la transcription et une stimulation par l'œstradiol plus faibles (Klinge, 2001).

Il a été montré, *in vitro*, par gel-retard, que la présence du ligand E2 ne modifie ni l'affinité du complexe ER-ERE ni sa constante cinétique d'association. D'autres auteurs ont montré que la fixation du ligand augmente l'affinité du ER pour l'ERE *in vivo* mais pas *in vitro* (Kladde *et al.*, 1996).

Très souvent, les gènes ne sont pas régulés par un seul ERE mais par plusieurs qui peuvent agir en synergie (Kraus *et al.*, 1994). Il a été montré que la fixation du récepteur aux œstrogènes lié à l'hormone est coopérative si au moins trois ERE sont présents (Klinge *et al.*, 1992; Anolik *et al.*, 1995; Tyulmenkov et Klinge, 2000).

VIII.1.2.2 Facteurs généraux de transcription

Le récepteur aux œstrogènes régule la transcription de gènes cibles en se fixant sur les éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) pouvant se trouver à plusieurs kilobases du site d'initiation de la transcription. Les récepteurs peuvent alors recruter la machinerie transcriptionnelle. Le complexe de pré-initiation (CPI) est formé de l'ARN polymérase II et de facteurs de transcription de bases : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH. Le facteur TFIID est lui-même un complexe constitué par l'interaction de TBP (*TATA-box Binding Protein*) avec les facteurs nommés TAFs (*TBP Associated Factor*) (Roeder, 1991). Il a été montré que le récepteur aux œstrogènes interagit directement avec certains de ces facteurs généraux tels que TFIIB (Ing *et al.*, 1992), TBP (Sadovsky *et al.*, 1995) ou TAFII30 (Jacq *et al.*, 1994) en présence ou en absence de ligand. L'interaction du récepteur aux œstrogènes humain α avec TBP se fait *via* les deux régions AF-1 et AF-2 (Sadovsky *et al.*, 1995), celle avec TAFII30 par l'intermédiaire du LBD de façon ligand-indépendante et cette interaction est requise pour l'activation de la transcription médiée par le récepteur (Jacq *et al.*, 1994). Chen et collaborateurs ont montré, qu'en présence d'œstradiol, une liaison du facteur TFIIH avec la région AF-2 du récepteur aux œstrogènes se produit. Il en résulte la phosphorylation du résidu S118 et une augmentation du phénomène de *trans*-activation (Chen *et al.*, 2000b). Dans ce système, les coactivateurs ne sont pas nécessaires pour induire la *trans*-activation du récepteur aux œstrogènes.

VIII.1.2.3 Corégulateurs transcriptionnels

Les corégulateurs transcriptionnels sont définis comme des protéines qui peuvent interagir avec les récepteurs nucléaires liés à l'ADN en augmentant leur fonction de *trans*-activation pour les coactivateurs ou en la diminuant pour les corépresseurs. Contrairement aux corépresseurs qui ne peuvent agir que directement sur le récepteur nucléaire, les coactivateurs peuvent également exercer leur fonction par l'intermédiaire d'autres protéines, les cointégrateurs. La Figure 22 présente un mécanisme d'action des corégulateurs. Le Tableau 9 regroupe une liste non exhaustive des corégulateurs interagissant directement ou non avec ER. Dans cette section, seuls les corégulateurs les plus décrits dans la littérature sont développés.

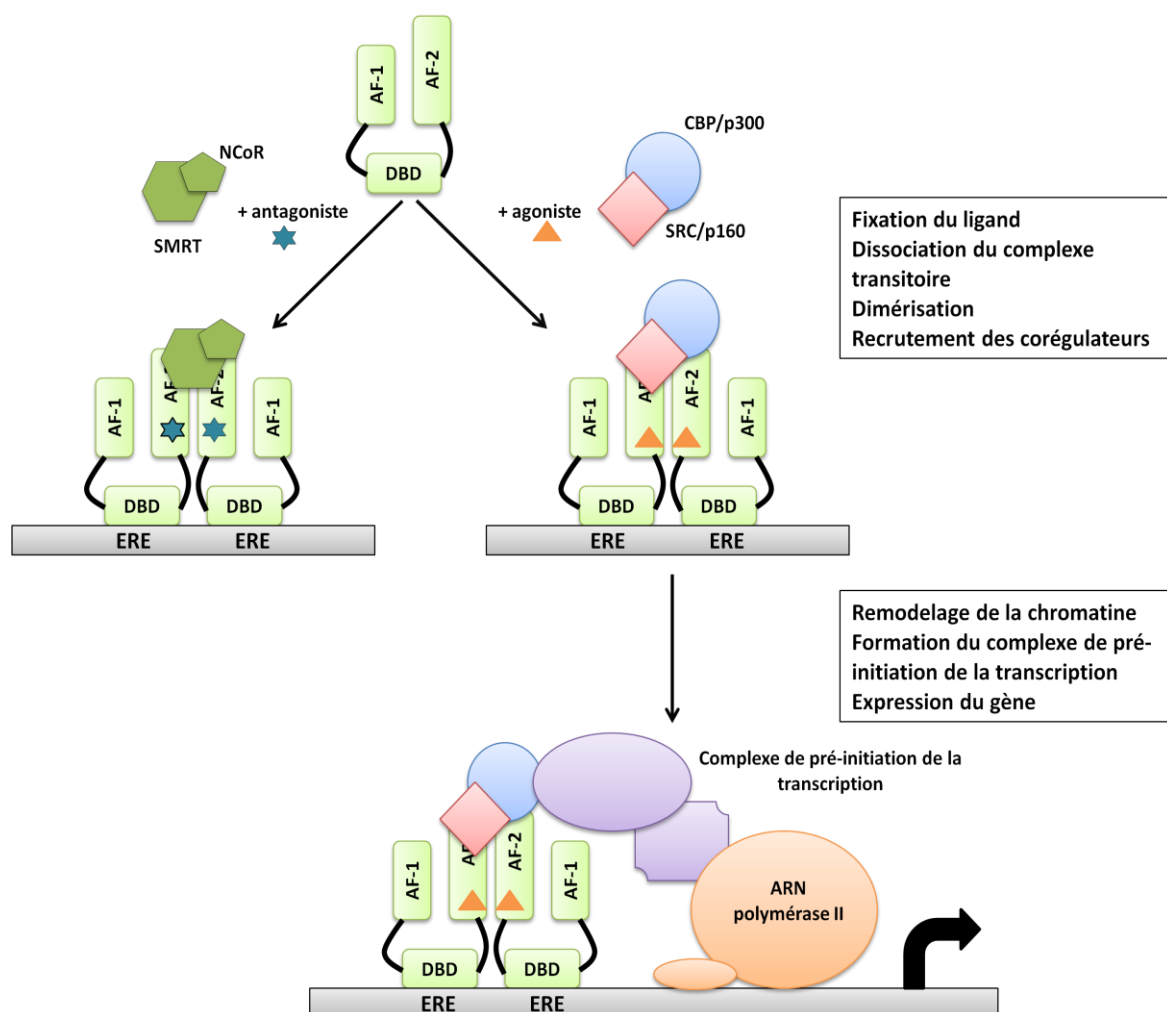


Figure 22 : Schéma simplifié du recrutement des corégulateurs par le récepteur aux œstrogènes et initiation de la transcription.

Les différentes étapes de ce mécanisme synthétique sont décrites à droite du schéma. Les corépresseurs sont indiqués en vert, les coactivateurs en rouge et les cointégrateurs en bleu. En violet est représenté le complexe de pré-initiation de la transcription et en orange, l'ARN polymérase.

Tableau 9 : Corégulateurs du récepteur aux œstrogènes (liste non exhaustive) (Klinge, 2000; Hall et McDonnell, 2005).

	Nom	Fonction	Interaction avec ER
Coactivateurs AF-2	SRC-1 (<i>Steroid receptor coactivator-1</i>)	HAT (Histone acétyltransférase)	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL Peut se lier à AF-1
	SRC-2 (<i>Steroid receptor coactivator-2</i>)	HAT	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	SRC-3 (<i>Steroid receptor coactivator-3</i>)	HAT	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	ASC-1 (<i>Activating signal cointegrator-1</i>)	Recrute des HAT	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	PELP-1 (<i>proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein-1</i>)	Recrute des HAT (comme CBP/p300) ou des méthyltransférases	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	E6-AP (<i>E6-associated protein</i>)	Ubiquitine-ligase	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
Coactivateurs AF-1	SRA (<i>Steroid receptor activator</i>)	Agit sous la forme d'un transcrit ARN	Liaison à AF-1
	p68	ARN hélicase	Liaison à AF-1
Coactivateurs secondaires	CARM-1 (<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>)	Arginine histone transférase	Interagit indirectement AF-2 <i>via</i> p160
	PRMT-1 (<i>Protein arginine N-methyltransferase</i>)	Arginine histone transférase	Interagit indirectement AF-2 <i>via</i> p160
Cointégrateurs	CBP/p300 (<i>CREB Binding Protein</i>)	HAT	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	TRAP (<i>Thyroid hormone receptor activating protein of 220 kDa</i>)	Interagit avec les facteurs généraux de la transcription	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	P/CAF (<i>CBP/p300-Associated Factor</i>)	HAT	Interagit indirectement <i>via</i> CBP ou p160
	ASC-2 (<i>Activating signal cointegrator-2</i>)	Permet le recrutement d'autres coactivateurs tels que SRC-1, CBP, TRAP ou DRIP	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	SMRT (<i>Silencing Mediator of Retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor</i>)	HDAC (Histone déacétylase)	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs CoRNR-boxes (LXXXIXXXL)
Corépresseur	NCoR (<i>Nuclear receptor CoRepressor</i>)	HDAC	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs CoRNR-boxes (LXXXIXXXL)
	REA (<i>Repressor of estrogen receptor activity</i>)	Interfère avec SRC-1 Interagit avec des protéines présentant une fonction HDAC	indirecte
	RTA (<i>Repressor of tamoxifen transcriptional activity</i>)	Interfère avec SRC-1 Réprime l'activité agoniste du tamoxifène	Liaison à AF-1
	LCoR (<i>Ligand-dependent CoRepressor</i>)	Interagit avec des protéines présentant une fonction HDAC	Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL
	TR2 (<i>Testicular Receptor 2</i>)	Peut interagir avec des protéines présentant une fonction HDAC	Liaison au niveau du LBD ou DBD
	RIP140 (<i>Receptor Interacting Protein, 140kDa</i>)		Liaison à AF-2 <i>via</i> les motifs LXXLL

Coactivateurs

Par définition, les coactivateurs interagissent directement avec le récepteur aux œstrogènes et active la transcription (Horwitz *et al.*, 1996). A la suite de la fixation du ligand, le récepteur aux œstrogènes subit un changement conformationnel, notamment par le repositionnement de l'hélice H12 contre les hélices H3, H5 et H11 du LBD (Brzozowski *et al.*, 1997). Le domaine AF-2 va former une poche hydrophobe, permettant l'interaction spécifique du récepteur avec des coactivateurs possédant un motif caractéristique LXXLL (NR-Box). Il existe de nombreux coactivateurs possédant ce motif et ils répondent tous à trois critères essentiels : *i*) ils interagissent directement avec un domaine d'activation du récepteur, uniquement de manière agoniste-dépendante ; *ii*) ils interagissent avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle ; *iii*) seuls, ils ne doivent pas augmenter l'activité transcriptionnelle de base bien qu'ils contiennent une fonction d'activation autonome. De fait, en l'absence de récepteur aux œstrogènes, les coactivateurs ne peuvent pas être recrutés sur le promoteur et moduler la transcription (Robyr *et al.*, 2000). Il existe différents modes d'action des coactivateurs. Certains sont recrutés pour leur aptitude à former un pontage et ainsi recruter d'autres protéines. D'autres possèdent une activité histone acétyl-transférase qui leur permet d'acétyler les histones, afin de déstabiliser les contacts protéine-ADN et de décompacter la chromatine (Orphanides et Reinberg, 2000) et/ou d'acétyler d'autres facteurs. Et enfin, certains coactivateurs interviennent comme médiateurs entre le récepteur aux œstrogènes liés à l'ADN et la machinerie transcriptionnelle de base, par l'intermédiaire notamment du recrutement du complexe multienzymatique contenant l'ARN polymérase II (Figure 22). Plusieurs groupes de coactivateurs ont ainsi été identifiés.

Les coactivateurs de la famille SRC (*Steroid Receptor Coactivator*) ou p160 comprennent trois membres de protéines fortement homologues (environ 40%) (SRC-1, SRC-2 et SRC-3) dont la masse moléculaire apparente est de 160 kDa (Halachmi *et al.*, 1994; McKenna *et al.*, 1999a). Leur structure (Figure 23) présente des domaines hautement conservés dont des NR-boxes impliquées dans l'interaction avec le LBD du récepteur ligandé (SRC-1 possède une NR-box supplémentaire à l'extrémité C-terminale) (Le Douarin *et al.*, 1996; Heery *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997) et un domaine riche en glutamines (Q-rich) impliqué dans diverses interactions protéine-protéine (en particulier avec la région A/B de certains récepteurs nucléaires).

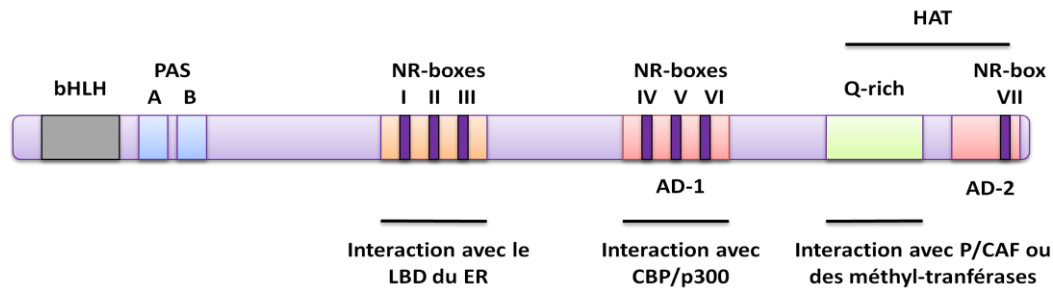


Figure 23 : Représentation schématique de la famille des coactivateurs SRC/p160.

Seul SRC-1 possède la septième NR-box et seuls SRC-1 et SRC-3 sont dotés d'une activité histone acétyl-transférase (HAT). bHLH (*basic Helix Loop Helix*) et PAS (*Per-ARNT Sim homology*) sont impliqués dans la formation de complexe multimérique (McKenna *et al.*, 1999a) ; AD-1 et AD-2 : (Activation Domain 1,2) interagissent avec d'autres corégulateurs comme CBP/p300 ; Q-rich : domaine riche en glutamines. (Klinge, 2000).

SRC-1 et SRC-3 présentent une activité histone acétyl-transférase (HAT) leur permettant d'acétyler des résidus lysine de l'extrémité N-terminale des histones H3 et H4 dans la chromatine, inhibant ainsi leur association à l'ADN (Spencer *et al.*, 1997). Cette acétylation altère également la stabilité et la conformation des nucléosomes, active la formation du complexe de pré-initiation et facilite l'activation de la transcription par l'ARN polymérase II. Plusieurs études ont montré que le domaine AF-2 n'est pas la seule région du récepteur aux œstrogènes capable de recruter les coactivateurs. La région AF-1 peut interagir avec certains membres de la famille p160/SRC (Webb *et al.*, 1998). Ce type d'interaction, beaucoup plus faible que celle de la fonction AF-2, pourrait être suffisant pour recruter des coactivateurs en présence d'antagonistes partiels tels que le 4-OHT. Il a également été montré que les deux fonctions interagissaient de façon synergique et que ce mode de fonctionnement impliquait le recrutement coopératif de coactivateurs dans le cas de l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain (Benecke *et al.*, 2000). Les fonctions AF-1 et AF-2 ne seraient donc pas indépendantes l'une de l'autre.

SRC-1 interagit en augmentant l'activité transcriptionnelle des gènes régulés par de nombreux récepteurs nucléaires dont les deux isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes humain, uniquement en présence d'agonistes (Halachmi *et al.*, 1994). SRC-1 peut également interagir avec des facteurs généraux de la transcription TBP et TFIID (Takeshita *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 1999) ainsi que d'autres facteurs de transcription tels que c-Jun et c-Fos (Lee *et al.*, 1998) et AP-1 (*Activator Protein-1*). Ceci suggère que SRC-1 est un composant important de multiples voies de signalisation intracellulaire (Lee *et al.*, 1998; Na *et al.*, 1998; Werbajh *et al.*, 2000).

La présence de SRC-2 (ou NCoA-2) permet une augmentation de la *trans*-activation du récepteur aux œstrogènes α en présence de E2, mais non en présence de 4-OHT (Hong *et al.*, 1996; Voegel *et al.*, 1998). Webb et collaborateurs ont montré que SRC-2 interagissait également avec le LDB du hER β avec une faible augmentation de l'activité transcriptionnelle comparée à celle de hER α (Webb *et al.*, 1999). Ceci suggère l'existence de coactivateurs spécifiques à chacune des deux isotypes du récepteur aux œstrogènes.

Contrairement aux deux autres membres, SRC-3 présente certaines particularités fonctionnelles. En effet, en présence de hER α , il forme un complexe ternaire avec P/CAF (CBP/p300-Associated Factor) et CBP/p300 (Chen *et al.*, 1997). Les gènes régulés par hER α voient leur transcription augmentée en présence de E2 et SRC-3 contrairement à ceux régulés par l'isotype β (Anzick *et al.*, 1997; Suen *et al.*, 1998). Cela renforce l'idée selon laquelle les deux isotypes utilisent des coactivateurs différents.

Cointégrateurs

Les cointégrateurs sont des protéines de masse moléculaire généralement élevée retrouvées dans des complexes multiprotéiques présentant plusieurs activités fonctionnelles. Différentes études ont montré que la fixation de cointégrateurs augmentait l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Cette augmentation proviendrait d'une meilleure interaction entre le récepteur et ses coactivateurs.

CBP et p300 sont des coactivateurs impliqués dans de multiples voies de signalisation. Ces deux protéines présentent de forte similarité fonctionnelle et sont donc regroupées sous l'acronyme CBP/p300. Ce sont des protéines ubiquitaires possédant une activité histone acétyl-transférase (HAT) et contenant des NR-boxes nécessaires pour interagir directement avec les récepteurs nucléaires (Figure 24). Des études ont montré également que le recrutement de CBP/p300, à la surface du récepteur, nécessite la présence d'un coactivateur de la famille SRC (Kamei *et al.*, 1996; Torchia *et al.*, 1997; Voegel *et al.*, 1998). Cette interaction tripartite ER α /SRC-1/CBP donne lieu à un complexe très stable pouvant recruter des facteurs de la machinerie transcriptionnelle tels que TBP et TAFs et permet une *trans*-activation accrue (Janknecht et Nordheim, 1996).



Figure 24 : Organisation structurale de CBP/p300 et des interactions avec les différents coactivateurs et facteurs de transcription.

Les domaines d'interaction avec les différents facteurs de transcription ou coactivateurs sont représentés dans la partie basse du schéma. ER, *Estrogen Receptor* ; TBP, *TATA-Binding Protein* ; CREB, *c-AMP Response Element Binding*, HAT, activité histone acétyltransférase ; TFIIB, facteur de transcription ; P/CAF, *CBP/p300 Associated Factor* ; SRC/p160, *Steroid Receptor Coactivator*.

P/CAF (*CBP/p300-Associated Factor*) est un cointégrateur possédant une activité HAT. Il est capable de provoquer l'activation de la transcription en interagissant avec CBP ou SRC-1 (Blanco *et al.*, 1998; Korzus *et al.*, 1998) ou directement avec le récepteur aux œstrogènes. Il a également été montré que P/CAF est recruté par la cycline D1 qui joue le rôle de pontage entre le récepteur aux œstrogènes et SRC-1 (Neuman *et al.*, 1997; Zwijsen *et al.*, 1997; Zwijsen *et al.*, 1998; McMahon *et al.*, 1999). Les interactions entre les différentes protéines permettraient une meilleure stabilité de l'ensemble sur le promoteur.

Corépresseurs

Un répresseur, au sens strict, se définit comme une molécule qui interagit directement avec le récepteur en absence de ligand, tout en stimulant la répression de l'activité basale d'un gène rapporteur. Un corépresseur doit également interagir avec la machinerie transcriptionnelle basale et posséder un domaine de répression autonome.

La fixation sur ER d'un ligand antagoniste a pour conséquence de positionner l'hélice- α H12 du LBD dans une conformation telle que le site de fixation des coactivateurs est masqué. Cette conformation permet le recrutement de corépresseurs et bloquerait la fonction AF-2 du récepteur mais aussi sa fonction AF-1 ligand-indépendante.

Une compétition entre les coactivateurs et les corépresseurs peut être à l'origine de l'effet mixte des antagonistes partiels. A ce jour, il a été recensé plus d'une vingtaine de corépresseurs du récepteur aux œstrogènes (Klinge, 2000; Dobrzycka *et al.*, 2003; Hall et McDonnell, 2005).

SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor*) et **NCoR** (*Nuclear receptor CoRepressor*) sont les corépresseurs les mieux documentés (Chen et Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995). Ces deux corépresseurs interagissent avec le récepteur aux œstrogènes *via* des motifs conservés : LXXXIXXXL appelés CoRNR-boxes (*CoRepressor Nuclear Receptor* boxes). Ces motifs ressemblent aux motifs LXXLL des coactivateurs et formeraient également des hélices- α (Hu et Lazar, 1999; Nagy *et al.*, 1999; Perissi *et al.*, 1999). D'autre part, des études ont suggéré que les hélices- α H3, H4, H5 et H11 du domaine E du ER sont impliquées dans la liaison des corépresseurs, indiquant que les coactivateurs et les corépresseurs utilisent une interface d'interaction chevauchante à la surface du récepteur (Horlein *et al.*, 1995; Zamir *et al.*, 1997; Burke *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 2000). SMRT interagit indépendamment du ligand avec ER. Contrairement à E2, en présence de 4-OHT, la fixation de SMRT sur ER a pour conséquence de diminuer la transcription des gènes cibles (Smith *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que ER α non complexé au ligand est associé à SMRT et que les anti-œstrogènes permettent de conserver cette interaction alors que les œstrogènes favorisent leur dissociation (Smith *et al.*, 1997). NCoR est également capable de réprimer l'activité des récepteurs aux œstrogènes en présence d'antagoniste par inhibition de leur activité AF-1 (Smith et O'Malley, 2004). Ces cofacteurs peuvent se lier à des corépresseurs secondaires pour former des complexes présentant une activité histone-déacétylase (HDAC). La déacétylation des histones renforçant l'interaction histones/ADN, induit la compaction de la chromatine est plus compacte, le recrutement limité des coactivateurs et la réduction de la transcription des gènes cibles réduite.

VIII.1.3 Mécanisme d'action génomique « ERE-indépendante »

Certains gènes régulés *via* le récepteur aux œstrogènes ne présentent pas, dans leur région promotrice, de séquence d'ADN similaire aux ERE. La fixation du récepteur aux œstrogènes sur l'ADN doit alors être médiée par des facteurs de transcription (O'Lone *et al.*, 2004). Dans ce cas, le DBD du récepteur ne se lie pas à l'ADN, mais est impliqué dans l'interaction avec les facteurs de transcription et autres protéines régulatrices. Deux voies de signalisation génomiques « ERE-indépendantes » différentes ont été décrites (Figure 19).

Le mécanisme le plus fréquemment retrouvé est celui impliquant la protéine Sp1 (*Stimulating protein 1*). Sp1 s'associe à une séquence régulatrice spécifique, riche en GC, de la région

promotrice du gène. En présence d'œstradiol, le récepteur aux œstrogènes s'associe à ce facteur. Il semblerait que le DBD du récepteur soit impliqué dans cette interaction. Il en résulte un recrutement d'autres cofacteurs et de la machinerie transcriptionnelle (Batistuzzo de Medeiros *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999; O'Lone *et al.*, 2004). Ce mécanisme peut aussi être mis en place en présence ou en absence de ligand (Porter *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003). D'autre part, il semblerait que le complexe ER β /Sp1 ne soit pas actif (Kim *et al.*, 2003).

Les deux isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes peuvent interagir avec un dimère de facteurs de transcription c-Fos/c-Jun. Le complexe ainsi formé nommé AP-1 (*Activator Protein-1*) peut se fixer au niveau de sites nucléotidiques TRE (*TPA Response Element*) et induire l'expression du gène. Il a été suggéré que les gènes œstrogéno-dépendants, régulés *via* AP-1, contribuent à la spécificité tissulaire du fait des activations opposées de ER α et ER β . Dans le système AP-1, les œstrogènes (E2 et DES) et les anti-œstrogènes (4-OHT et Ral) ont des effets de natures distinctes selon qu'ils se fixent sur hER α ou hER β (Paech *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999) :

- sur hER α , E2 et DES se comportent comme des agonistes et, 4-OHT et Ral comme des antagonistes partiels
- sur hER β , E2 et DES se comportent comme des antagonistes et 4-OHT et Ral comme des agonistes.

Ces mécanismes requièrent les domaines d'activation AF-1 et AF-2. AF-2 permet le recrutement des coactivateurs de la famille p160/SRC pour stabiliser le complexe protéique. (Kushner *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 2001; Safe et Kim, 2008).

VIII.1.4 Mécanisme d'action génomique « ligand-indépendante »

A ce jour, il est connu que les récepteurs aux œstrogènes peuvent être activés en absence d'hormone. Les facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*) et TGF α (*Transforming Growth Factor*) sont capables d'induire, en absence d'E2, une phosphorylation du récepteur aux œstrogènes par le biais des MAPKs (notamment la voie de signalisation Ras/Raf/MAPK). Il a été montré, *in vitro*, que cette voie menait à la phosphorylation du résidu S118 de hER α (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996) ou de S167 (Joel *et al.*, 1998a). Ces résultats sont concordants

avec des études menées *in vivo*, montrant qu'EGF avait la capacité de mimer les effets d'E2 dans les cellules utérines (Curtis *et al.*, 1996). L'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA), par un dérivé stable de l'AMPc (le 8-bromo-AMPc) et un activateur de l'adénylate cyclase, augmente la phosphorylation du résidu S305 du récepteur et son activité transcriptionnelle en présence de E2.

La phosphorylation n'est pas le seul mécanisme permettant une induction de la *trans*-activation ligand-indépendante du récepteur. Zwijsen et collaborateurs ont montré que la cycline D1 peut interagir directement avec le LDB du récepteur et recruter des coactivateurs de la famille p160/SRC (SRC-1), CBP/p300 ou P/CAF. La cycline D1 sert alors de pontage entre le ER et les coactivateurs. Il en résulte la *trans*-activation du récepteur en absence d'hormone (Zwijsen *et al.*, 1997; Zwijsen *et al.*, 1998).

VIII.2 Action non génomique de l'œstradiol

Un grand nombre d'études ont prouvé que les œstrogènes pouvaient moduler la fonction des protéines *via* des actions non-génomiques. Certains effets sont beaucoup trop rapides (de quelques secondes à quelques minutes) pour être dus à l'activation de l'expression de gènes. L'utilisation d'inhibiteurs de transcription (actinomycine D) ou de traduction (cycloheximide) ne suppriment pas ces effets, confirmant qu'ils ne sont pas liés à une action génomique (Losel et Wehling, 2003).

Il a été montré, par différentes études, que E2 était capable d'activer plusieurs voies de signalisation cellulaire. Ainsi, il permettrait d'augmenter les flux calciques dans les cellules de la granulosa (Batra, 1986; Morley *et al.*, 1992). Il est aussi impliqué dans l'activation de la production d'AMPc et d'IP₃ (Inositol triphosphate) dans certains tissus (Grove et Korach, 1987; Ignar-Trowbridge *et al.*, 1991; Aronica *et al.*, 1994; McEwen et Alves, 1999). E2 active aussi rapidement la voie des MAP kinases et inhibe tout aussi rapidement l'activité MAPK phosphatase-1, modulant l'activité de la kinase ERK (*Extracellular Regulated Kinase*) dans les cellules cancéreuses mammaires (Razandi *et al.*, 2004). E2 stimule également la voie PI3K/Akt (Simoncini *et al.*, 2000; Hisamoto *et al.*, 2001). La plupart de ces actions non génomiques sont attribuées à la présence d'un récepteur aux œstrogènes localisé dans la membrane des cellules

IX. Fonctionnalités de hER α et hER β

Les effets biologiques des œstrogènes sont médiés par les isotypes α et β du récepteur aux œstrogènes. Ces deux récepteurs sont coexprimés dans de nombreux tissus mais possèdent des différences d'activité transcriptionnelle en fonction des ligands, du contexte cellulaire et du promoteur étudiés.

Plusieurs études ont montré que hER α et hER β ne possédaient pas la même capacité (qualitativement et quantitativement) à activer la transcription de gènes cibles. Selon le type cellulaire et le promoteur testé, l'activité transcriptionnelle de ER β représente 10 à 60% de celle de ER α (Mosselman *et al.*, 1996; Pettersson *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998a; Cowley et Parker, 1999; Hall et McDonnell, 1999; Hanstein *et al.*, 1999). Néanmoins, Watanabe et collaborateurs ont comparé les activités biologiques des deux isotypes du hER exprimés dans différentes cellules. Ils notent que hER α , en présence de E2, possède une activité biologique supérieure à hER β dans la moitié des cellules étudiées (l'inverse étant observé pour la seconde moitié) alors que Cowley et collaborateurs observent que l'activité cellulaire de l'isotype β varie de 3 à 50% de celle de l'isotype α selon le contexte cellulaire (Watanabe *et al.*, 1997; Cowley et Parker, 1999).

De plus, une série d'expériences menées sur une grande variété de promoteurs et dans différents types de cellules, en absence d'hormone, a révélé que ER α présente une activité transcriptionnelle basale plus élevée que celle de ER β . Ces données suggèrent que les fonctions AF-1 et AF-2 de l'isotype α sont plus actives que celles de l'isotype β (Cowley et Parker, 1999; Hall et McDonnell, 1999; Loven *et al.*, 2001).

Ces deux récepteurs présentent des réponses différentes vis-à-vis du 4-OHT et du raloxifène, deux anti-œstrogènes synthétiques : ces ligands sont des antagonistes partiels de ER α contrairement à ER β où ils agissent comme des antagonistes purs (Watanabe *et al.*, 1997; Barkhem *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 1998). Ceci pourrait être expliqué par les dissemblances observées au niveau de l'extrémité N-terminale des deux isotypes ainsi que leur affinité différente vis-à-vis des ligands (K_D hER α -E2 = 11,2nM et K_D hER β -E2 = 8,9nM, Tableau 6) (Zhu *et al.*, 2008). D'autre part, plusieurs travaux ont été menés afin de connaître l'impact de la liaison aux ligands sur la fonctionnalité du récepteur aux œstrogènes *in vivo*. Selon qu'il s'agisse d'une expérience menée sur des cellules Hela ou *Saccharomyces cerevisiae*, les EC₅₀ (concentration en ligand nécessaire pour observer 50% de la réponse maximale) obtenus en présence de E2 et varient de 0,17 à 4,4.10⁻¹⁰ M pour hER α et de 0,7 à

$1,1 \cdot 10^{-10}$ M pour hER β (Wooge *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 1995; Beresford *et al.*, 2000; Jisa *et al.*, 2001; Schultis et Metzger, 2004; Escande *et al.*, 2006).

Une autre explication de la différence de réponse vis-à-vis des ligands proviendrait de la participation des corégulateurs. En effet, les deux isotypes peuvent présenter des affinités différentes vis-à-vis des corégulateurs en fonction des ligands testés. Ainsi, en présence d'E2, ils présentent une affinité identique pour une partie des coactivateurs de la famille p160/SRC alors qu'en présence de génistéine (un phytoœstrogène), ces coactivateurs sont plus fortement recrutés sur ER β (Routledge *et al.*, 2000). De plus, ER β , contrairement à ER α , interagit avec SRC-1 en absence de ligand (Tremblay *et al.*, 1997). Il a également été montré que la présence du coactivateur p68 avait pour conséquence d'accroître l'activité transcriptionnelle de ER α et non celle de ER β (Wu *et al.*, 2001).

D'autre part, ER α et ER β présentent des effets opposés au niveau de la *trans*-activation des gènes cibles *via* AP-1. Les anti-œstrogènes permettent une activité de ER β sur les promoteurs AP-1, alors que E2 bloque la transcription. En présence de ER α , la réponse est inversée (Paech *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999).

Il est communément admis que hER α joue un rôle déterminant dans l'initiation et la progression tumorale mammaire ; par ailleurs, de récentes études suggèrent que hER β peut supprimer cette progression tumorale mammaire (Paruthiyil *et al.*, 2004; Ström *et al.*, 2004). Ainsi, dans certains tissus, hER α et hER β présentent des fonctions biologiques différentes voire opposées, et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus restent encore obscurs.

Les deux récepteurs aux œstrogènes sont coexprimés dans de nombreux tissus et peuvent former des hétérodimères. ER β paraît être un régulateur dominant du signal œstrogénique, car lorsqu'il forme un hétérodimère avec ER α , l'activité transcriptionnelle observée est beaucoup plus faible que celle observée avec un homodimère de ER α (Pettersson *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). A ce jour, la littérature ne décrit pas les raisons de l'existence de deux isotypes du récepteur aux œstrogènes et non d'un seul.

Le mécanisme moléculaire gouvernant l'expression tissu-spécifique des deux isoformes reste encore inconnu. De plus, le rôle que jouent les hétérodimères ER α /ER β dans la voie de signalisation des œstrogènes notamment en médiant l'effet répresseur de l'isotype β sur l'activité de l'isotype α n'est toujours pas compris. Une meilleure compréhension de ces différents points pourrait permettre à l'industrie pharmacologique de développer des ligands

spécifiques de chacun des deux isotypes afin de traiter les symptômes de la ménopause, de l'ostéoporose et du cancer du sein.

X. Récepteur aux œstrogènes de la truite arc-en-ciel : rtER

Chez les organismes ovipares, un des gènes cibles du récepteur aux œstrogènes est le gène de la vitellogénine (*vtg*). La vitellogénine, précurseur des protéines du vitellus est indispensable au développement embryonnaire. Comme chez d'autres espèces (xénope, poulet), sa synthèse est régulée par l'œstradiol *via* le récepteur aux œstrogènes, qui lui-même s'autorégule, c'est-à-dire qu'il possède une expression dépendante de cette hormone (Maitre *et al.*, 1985; Pakdel *et al.*, 1991). La synthèse de ces deux protéines est donc corrélée (Flouriot *et al.*, 1997).

X.1 Isotype alpha du récepteur aux œstrogènes de la truite arc-en-ciel : rtER α

Le premier récepteur aux œstrogènes de poisson a été identifié par Pakdel et collaborateurs dans le foie de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Pakdel *et al.*, 1989; Pakdel *et al.*, 1990). Par la suite, il a été mis en évidence à partir d'une banque d'ADNc issus d'ovaire de truite, l'existence d'un variant d'épissage (ou issu de l'utilisation d'un promoteur différent) qui diffère du premier rtER identifié par l'addition de 45 résidus aminoacides à l'extrémité N-terminale, le reste de la séquence étant identique (Pakdel *et al.*, 2000). La forme courte est ainsi appelée rtER_S (S pour *short*) et la forme longue : rtER_L (L pour *length*). Un alignement de séquences indique que les isoformes rtER_L (et par conséquent rtER_S) correspondrait à l'isotype α (Sumida *et al.*, 2003).

X.1.1 Isoforme courte : rtER_S

L'isoforme courte étant la première isoforme du récepteur de la truite identifiée et étant celle qui est majoritairement retrouvée dans le foie des poissons, elle est la plus largement étudiée. Ce récepteur se différencie du hER α par l'absence de 37 résidus aminoacides du domaine A (Figure 25).

Les domaines de fixation à l'ADN (DBD) et à l'hormone (LBD) du rtER_S sont les deux régions présentant la plus forte identité de séquence avec l'isotype α humaine : respectivement 92% et 60%. Le DBD des deux récepteurs ne diffère que par 7 résidus aminoacides. La comparaison des LBD a permis de mettre en évidence deux résidus aminoacides du site de fixation du ligand, divergeant entre les récepteurs des deux espèces : L349, M528 pour hER α et M317, I496 pour rtER_S (Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999). Ces substitutions conduisent à un récepteur présentant une plus faible affinité pour son ligand et un phénomène de *trans*-activation moindre que celui de hER α : K_D rtER_S-E2 = 1,35 nM et K_D hER α -E2 = 0,35nM (Wooge *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 2001). Ces constantes ont été déterminées *in vitro* sur des extraits cellulaires et diffèrent donc des valeurs présentées dans le tableau 6. Une multitude d'études a montré que le récepteur aux œstrogènes de poisson -isolé à partir de tissus ou exprimé dans d'autres types cellulaires- se lie à un éventail de composés généralement en modulant son activité transcriptionnelle de la même manière que celle décrite pour les ER α de mammifères (Le Drean *et al.*, 1995; Latonnelle *et al.*, 2002; Menuet *et al.*, 2002; Hawkins et Thomas, 2004; Menuet *et al.*, 2004; Leanos-Castaneda et Van Der Kraak, 2007).

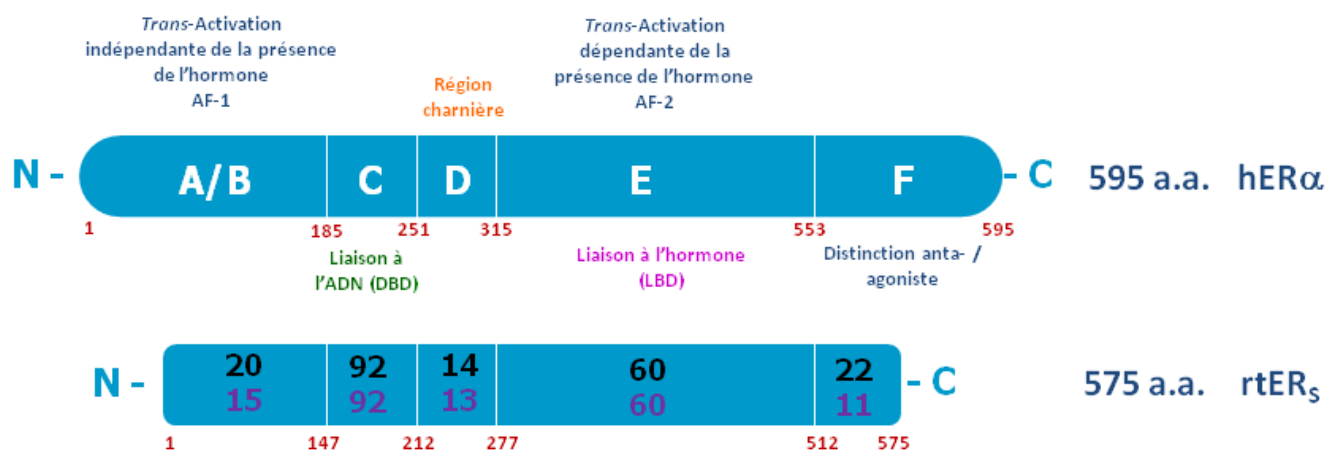


Figure 25 : Organisation structurale et fonctionnelle du hER α et du rtER_S.

La séquence primaire du rtER_S est tronquée aux extrémités N et C-terminales. Cette figure présente également le pourcentage d'identité de séquence des différents domaines entre hER α et rtER_S (en noir) et entre hER β et rtER_S (en violet). AF-1 : *Activation Function-1* ; AF-2 : *Activation Function-2* ; DBD : *DNA Binding Domain* ; LBD : *Ligand Binding Domain* ; NLS : *Nuclear Localization Site*.

Le récepteur aux œstrogènes de la truite présente une particularité au niveau fonctionnel. En effet, contrairement à hER α qui possède une activité transcriptionnelle uniquement en présence d'hormone, rtER_S présente une activité basale importante (15 à 25% de l'activité maximale en présence de ligand) (Petit *et al.*, 1995).

Une autre fonctionnalité caractéristique du rtER_S, comparé au hER α , est sa dépendance à la température. Alors que l'activité transcriptionnelle du hER α reste stable sur une large gamme de température (indiquant sa grande stabilité), le rtER_S voit son activité modulée par la température (Le Drean *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 2001; Sumida *et al.*, 2003). A température élevée, le rtER_S présente une affinité plus faible pour l'œstradiol, ce qui a pour conséquence de diminuer la *trans*-activation (Petit *et al.*, 1995).

Une expérience où des protéines chimères ont été construites à partir des domaines fonctionnels de hER α et rtER_S, a montré que la fusion du domaine C de hER α sur le rtER_S permet à la protéine chimère d'interagir plus rapidement avec l'ERE et de doubler son temps de demi-vie. Ces résultats suggèrent que le domaine C du hER α est responsable d'une meilleure stabilité du complexe (Petit *et al.*, 2000). Il a aussi été observé des interactions entre le rtER_S et certains coactivateurs. Ainsi, Petit et collaborateurs ont mis en évidence l'association du récepteur orphelin COUP-TFI (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor*) avec le récepteur, suggérant la nécessité d'une interaction protéine-protéine pour stabiliser le complexe ER-ADN (Petit *et al.*, 1999). COUP-TF1 peut aussi interagir avec des kinases capables de phosphoryler le récepteur aux œstrogènes humain et ainsi recruter des coactivateurs pour augmenter les phénomènes de *trans*-activation (Metivier *et al.*, 2002).

X.1.2 Isoforme longue : rtER_L

Cette isoforme longue identifiée en 2000 par Pakdel et collaborateurs présente 45 résidus aminoacides supplémentaires à l'extrémité N-terminale par rapport à rtER_S. La stimulation par E2 de rtER_L est deux fois plus faible que celle observée pour le rtER_S indiquant que l'isoforme longue présente une fonction de *trans*-activation indépendante de la présence de l'hormone différente (Pakdel *et al.*, 2000; Vetillard et Bailhache, 2006). De plus, contrairement à la forme courte mais comme pour le hER α , le rtER_L ne présente aucune activité transcriptionnelle indépendante de l'hormone.

X.2 Isoformes rtER α 2, rtER β 1 et rtER β 2

Chez de nombreuses espèces de poissons, il a été mis en évidence l'existence d'un récepteur aux œstrogènes de type β ; sa présence chez la truite arc-en-ciel a donc été fortement suggérée (Menuet *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2002). Aujourd'hui, l'hypothèse selon laquelle le génome des actinoptérygiens (poissons à nageoires rayés) a été en partie voire même entièrement dupliqué se vérifie (Wittbrodt *et al.*, 1998; Thornton, 2001). En effet, la truite arc-en-ciel exprime deux IGF (1 et 2) alors qu'un seul est retrouvé chez les vertébrés supérieurs. Il existe deux isoformes du récepteur aux IGF chez les vertébrés supérieurs alors que les saumons en possèdent deux copies de chaque. La limande du Japon exprime également deux copies des récepteurs α et β des hormones thyroïdiennes (Wittbrodt *et al.*, 1998). Il n'est donc pas surprenant que très récemment, Nagler et collaborateurs aient découvert et cloné les gènes codant pour les deux isoformes de rtER β : rtER β 1 et rtER β 2 dans un mélange de tissus de testicule, d'ovaire et foie de truite arc-en-ciel. De plus, ils ont également découvert un second rtER α qu'ils ont nommé rtER α 2 (le rtER α 1 correspondant au récepteur identifié par Pakdel et collaborateurs, rtER $_S$ et rtER $_L$) (Nagler *et al.*, 2007).

En présence d'E2 ou d'éthinylœstradiol (EE2), le niveau d'ARNm de rtER α 1 et celui de la vitellogénine sont fortement augmentés dans les hépatocytes de truite, comme ce qui a été décrit précédemment (Flouriot *et al.*, 1996). Au contraire, le niveau d'ARNm des trois autres formes est peu affecté (Boyce-Derricott *et al.*, 2009). L'équipe de Nagler a également rapporté une présence ubiquitaire de ces quatre récepteurs dans différents tissus de la truite mais rtER α 1 et rtER β 2 sont les deux formes les plus fortement exprimées (Nagler *et al.*, 2007).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'action des œstrogènes est médiée par le récepteur aux œstrogènes. Des déficiences en œstrogènes sont impliquées dans des pathologies telles que l'artériosclérose, l'ostéoporose et dans des processus dégénératifs du système nerveux central. Au contraire, un niveau hormonal trop élevé conduit à la formation de tumeurs. Il est donc important, afin de traiter au mieux ces symptômes et ce, sans générer de nouvelles pathologies, de comprendre le mécanisme d'action du récepteur aux œstrogènes sur la régulation des gènes œstrogéno-dépendants.

Il est communément admis que hER α joue un rôle déterminant dans l'initiation et la progression tumorale mammaire. Par ailleurs, de récentes études suggèrent que hER β peut supprimer cette progression tumorale mammaire. Nous avons vu précédemment que les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain répondaient différemment vis-à-vis de certains ligands. Par exemple, le 4-hydroxytamoxifène et le raloxifène sont connus pour agir comme des antagonistes partiels sur hER α alors qu'ils présentent une action antagoniste pure sur hER β (Watanabe *et al.*, 1997; Barkhem *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 1998). Ces différentes observations sont utilisées par l'industrie pharmaceutique afin de synthétiser de nouveaux ligands sélectifs de l'un ou l'autre des isotypes du hER pour traiter les symptômes de la ménopause, de l'ostéoporose, etc. Il est donc important de comprendre parfaitement les effets agonistes ou antagonistes des molécules testées. A ce jour, de nombreuses études sont publiées sur le récepteur aux œstrogènes. Ces études sont menées *in vivo*, sur des cellules normales ou tumorales exprimant le ER de façon endogène ou sur des cellules n'en exprimant pas (par conséquent elles sont transfectées par un vecteur contenant le gène codant pour le ER). D'autres travaux sont réalisés *in vitro*, dans des conditions éloignées des conditions physiologiques, afin de comprendre par exemple les interactions protéine-protéine, protéine-ligands, protéine-ADN.

La première partie de notre étude a consisté à poursuivre les travaux menés sur la caractérisation d'une séquence ERE présente dans le gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel. L'expression de la vitellogénine est sous le contrôle de l'œstradiol et indirectement du récepteur aux œstrogènes. L'analyse de la région intergénique du gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel a révélé l'absence de séquence ERE consensus (ERE_{cs}) et la présence de deux séquences ERE potentielles. Il s'est avéré qu'une seule de ces séquences est « fonctionnelle » ; c'est-à-dire que le récepteur aux œstrogènes s'y fixe (avec une affinité plus faible que s'il s'agissait d'un ERE consensus) et induit la *trans*-activation du gène cible

(Bouter, 2003). Cette séquence imparfaite est nommée *rtvtgERE*. Quelles sont les conséquences sur la régulation hormonale ? Nous nous sommes donc attachés à caractériser les interactions nécessaires à la stabilité des complexes hER-ERE_{cs} et hER-*rtvtgERE* et à la stabilité thermodynamique et thermique des récepteurs. Ces études menées par spectroscopie de fluorescence sont réalisées en solution afin de prendre en compte l'effet des paramètres physico-chimiques sur les complexes formés. Ces expériences ont été réalisées sur les deux récepteurs aux œstrogènes purifiés et commercialisés : hER α et hER β .

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à mener une étude structurale et physico-chimique. S'il est connu que la fixation des ligands engendre un changement dans la conformation du ER, les conséquences en terme de flexibilité globale du récepteur n'ont pas été recherchées non plus que le rôle des interactions électrostatiques sur cette dynamique. D'ores et déjà, il a été montré, par des mesures d'anisotropie de fluorescence, que l'interaction hER α -ERE dépend de la séquence ERE et de la concentration saline (Bouter, 2003). Plus le complexe hER α -ERE est fort (hER α -ERE_{cs}), moins la concentration en sel a un effet sur l'affinité du complexe. Aussi, plus le complexe hER α -ERE est faible (hER α -*rtvtgERE*), plus une augmentation de la concentration saline déstabilise le complexe. En est-il de même avec hER β ? D'autre part, la flexibilité moléculaire de hER α , mesurée par des expériences d'atténuation (ou quenching) de fluorescence, dépend de la concentration saline : plus la concentration saline est importante, plus la protéine est contrainte. Une corrélation entre la stabilité des complexes et la flexibilité globale du récepteur a pu être établie. L'isotype β du récepteur aux œstrogènes humain présente une activité cellulaire opposée à celle de l'isotype α . Or ces deux protéines ont peu d'identité de séquence (47%), nous pouvons nous demander si leur différence en terme de fonctionnalité ne serait pas due à des différences de formation ou de stabilité des complexes.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons recherché l'impact de la liaison aux hormones sur l'activité cellulaire et la localisation subcellulaire du ER. Nous avons vu précédemment dans ce manuscrit que les deux isotypes du hER possèdent des différences de fonctionnalité en fonction du ligand, du contexte cellulaire et du promoteur étudiés. Au vu de tous ces résultats, il paraît hasardeux de proposer un mécanisme global d'action du récepteur aux œstrogènes. Notre équipe s'est donc attachée à mener ses travaux sur un système cellulaire unique : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce système cellulaire a déjà été utilisé

afin de caractériser le rtER, d'identifier des gènes inductibles par E2 et de screener des xénobiotiques à activité œstrogénique (Pham *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 1995; Metivier *et al.*, 2000b; Pakdel *et al.*, 2000). Nous avons donc choisi de comparer les propriétés de 2 récepteurs aux œstrogènes présentant des structures primaires distinctes - hER α et rtER γ - en réponse à la présence d'œstrogènes et d'anti-œstrogènes. Ainsi nous avons choisi d'étudier 5 molécules appartenant à chacune des 3 classes de ligands (classification établie suivant leur impact sur l'activité cellulaire du hER α), à savoir :

- 2 agonistes : E2 (œstrogène naturel) et diéthylstilbestrol (DES, œstrogène de synthèse)
- 2 antagonistes partiels : 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) et raloxifène (Ral)
- 1 antagoniste pur : ICI 182780 (ICI).

Afin de quantifier l'effet de ces différents ligands, nous avons entrepris la réalisation de courbes dose-réponse (mesure de l'activité cellulaire du ER en fonction de la concentration en ligand) et de cinétiques de la stimulation hormonale (mesure de l'activité cellulaire du ER en fonction du temps à partir de l'ajout de l'hormone dans le milieu de culture). Parallèlement à ces mesures, la distribution subcellulaire de hER α et rtER γ a été suivie en présence des différents ligands afin d'observer l'effet des ligands sur la localisation du ER.

Dans la dernière partie, nous présentons une étude préliminaire concernant l'impact de la phosphorylation de hER α et rtER γ sur l'activité cellulaire et la localisation subcellulaire des ER. En effet, nous avons vu précédemment que l'activité cellulaire de hER α est modulée par son état de phosphorylation ; celle de rtER γ n'a jamais été étudiée. Nous avons choisi une technique simple nous permettant d'obtenir rapidement des résultats : l'utilisation d'inhibiteurs de kinases.

Ce travail apporte de nouveaux éléments de réponse quant au mode d'action des œstrogènes et anti-œstrogènes et permet donc de mieux cerner le mode de fonctionnement du récepteur aux œstrogènes dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Note au lecteur :

Les principaux résultats expérimentaux sont donc présentés en quatre parties dont trois sous forme d'articles soumis ou en préparation. Chaque article est donc brièvement introduit, suit le corps de l'article puis, dans certains cas, sont présentées des données non publiées mentionnées dans l'article ou certaines perspectives découlant directement des données présentées.

Dans le but de rendre la lecture du manuscrit plus fluide, la section Matériels et Méthodes est reportée sous forme d'annexe en fin de document. L'essentiel des informations est en effet présenté dans le corps des articles.

RESULTATS

I. Chapitre 1 : Mise en évidence d'un ERE imparfait dans le gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel et recherche de l'effet de synergie d'un tandem de séquences ERE consensus

I.1 Introduction à l'article 1 intitulé "Control of vitellogenin genes expression by sequences derived from transposable elements in rainbow trout"

Le récepteur aux œstrogènes active la transcription des gènes cibles en se fixant à une séquence nucléotidique spécifique appelée Élément de Réponse aux Œstrogènes (ERE). La première séquence ERE a été observée dans la région promotrice du gène codant la vitellogénine A2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique de 13 paires de bases composée de deux demi-sites inversés répétés de 6 pb séparés par 3 pb : AGGTCAnnnTGACCT (Klein-Hitpass *et al.*, 1988; Klinge *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1998). Il a été montré que l'espacement de 3 pb constituait une condition *sine qua non* de l'interaction ER-ERE (Anolik *et al.*, 1995). La découverte de nombreux gènes œstrogéno-dépendants a permis de montrer que l'ERE_{cs} n'est généralement pas le plus retrouvé (environ 2 gènes sur 25), malgré son caractère optimal pour la fixation du récepteur aux œstrogènes (Klinge, 2001). Dans la majorité des cas, les ERE qui ont été caractérisés sont des séquences dites imparfaites ou dégénérées, dérivées de l'ERE_{cs}.

Les conséquences fonctionnelles de la dégénérescence des ERE sont une affinité plus faible du récepteur aux œstrogènes, une activation de la transcription et une stimulation par l'œstradiol également plus faible (Klinge, 2001). Très souvent les gènes ne sont pas régulés par un seul ERE mais par plusieurs qui peuvent agir en synergie (Kraus *et al.*, 1994). Il a été montré, pour les deux isotypes du hER, une nette augmentation de leur activité cellulaire mesurée en présence de plusieurs séquences ERE dans la région promotrice du gène rapporteur (Ponglikitmongkol *et al.*, 1990; Anolik *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 2000; Klinge, 2001; Sanchez *et al.*, 2002).

La vitellogénine (VTG) est le précurseur majeur des protéines du vitellus, nécessaire au développement embryonnaire. La VTG est produite en grande quantité par le foie des femelles matures sous le strict contrôle des œstrogènes. Cette régulation fait des gènes *vgt* un modèle de choix pour déchiffrer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la transcription. La VTG est codée par une petite famille de gènes (*vgt*) qui proviennent probablement de duplications ancestrales d'un gène unique. Contrairement aux autres

espèces, la truite arc-en-ciel possède environ 20 gènes et 10 pseudo-gènes vitellogénine (*rtvtg*) (Trichet *et al.*, 2000). Tous ces gènes sont situés sur un même locus et arrangés en tandem avec une région intergénique conservée de 4,6 kb. Les gènes *rtvtg* sont des gènes œstrogéno-dépendants régulés par les œstrogènes, *via* le récepteur aux œstrogènes (rtER) (Petit *et al.*, 1995). L'analyse de la région promotrice du gène *vgt2* a mis en évidence l'absence de séquence ERE consensus et la présence potentielle de plusieurs séquences ERE imparfaites (Mouchel, 1996; Buisine, 2000).

L'objectif de cette étude a consisté, dans une première partie, à rechercher et à identifier dans la région promotrice du gène *rtvtg*, la séquence ERE imparfaite (*rtvtgERE*). Pour cela, nous nous sommes attachés à analyser sa capacité à promouvoir l'initiation de la transcription d'un gène rapporteur à la suite de la fixation du ER ainsi que la sensibilité de réponse à l'œstradiol, *in vivo*. De plus, nous avons analysé les propriétés physiques de l'interaction entre les ERE potentiels et le récepteur aux œstrogènes par des mesures d'anisotropie de fluorescence. Nos résultats montrent que hER α se fixe spécifiquement sur la séquence imparfaite identifiée.

L'ensemble de nos résultats démontrent que la séquence GGGGCaggTAACT est une séquence ERE imparfaite fonctionnelle ; elle est notée *rtvtgERE*.

**Control of vitellogenin genes expression
by sequences derived from transposable elements in rainbow trout**

**Anthony Bouter^a, Nicolas Buisine^b, Adélaïde Le Grand, Nathalie Mouchel^c,
Véronique Le Tilly*, Jacques Wolff and Olivier Sire**

*Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux de Bretagne, Université de Bretagne-Sud,
CER Yves Coppens, BP573, 56017 Vannes CEDEX, France*

*^a present address: Molecular Imaging and NanoBioTechnology, UMR 5248 CBMN, CNRS-Université
Bordeaux I-ENITAB, IECB, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France.*

*^b present address: Museum National d'Histoire Naturelle, 57 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05,
France.*

*^c present address: Paediatric Molecular Genetics, Institute of Molecular Medicine, Oxford University,
John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DS, UK.*

*** Corresponding author:** Tel. 33 297 017 135; Fax. 33 297 017 071

E-mail address: letilly@univ-ubs.fr (V. Le Tilly)

Keywords: estrogen response element, estrogen receptor, vitellogenin, rainbow trout,
transfection assays, fluorescence anisotropy.

Abbreviations: TE, transposable element; TSS, transcriptional start site; cyc, cytochrome-c
oxidase; DO, drop-out supplement; E2, 17 β -estradiol; E_s, estrogens; ER, estrogen receptor;
ERE(s), estrogen response element(s); ERE_{cs}, consensus estrogen response element; hER,
human estrogen receptor; OD, optical density; rtER, rainbow trout estrogen receptor; rtVTG,
rainbow trout vitellogenin.

Abstract

Vitellogenins (VTG) are the major egg yolk precursors of oviparous animals. They are produced in the liver under the strict control of estrogens. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the *vtg* genes cluster contains an unusually large number of almost identical gene copies. In order to identify the regulatory elements in their promoters, we used a combination of reporter plasmids containing genomic sequences including putative estrogen response elements (EREs) and we performed transient transfection assays in MCF-7 and yeast cells. We found a functional ERE corresponding to the sequence GGGGCAnnnTAACCT (*rtvtg*ERE), which differs from the consensus ERE (ERE_{cs}) by three base pairs. This non-palindromic ERE is located in the *env* gene of a retrotransposon relic, 180 base pairs upstream of the transcriptional start site. Fluorescence anisotropy experiments confirmed that the purified human estrogen receptor α (hER α) can specifically bind to *rtvtg*ERE. Furthermore, we observe that the stability of hER α -ERE_{cs} and hER α -*rtvtg*ERE complexes is similar with equilibrium dissociation constants of 3.0 nM and 6.2nM respectively, under our experimental conditions. Additionally, this *rtvtg*ERE sequence displays a high E2-responsiveness through ER activation *in cellulo*.

In the rainbow trout, the functional ERE (*rtvtg*ERE) lies within promoter sequences which are mostly composed of sequences derived from transposable elements (TEs), which therefore may have acted as an evolutionary buffer to secure the proper expression of these genes.

1. Introduction

Estrogens (E_S) signaling pathways are key components of many biological processes such as differentiation, growth and embryogenesis, and are thus critical for many life traits. E_S biological activity is mediated by the estrogen receptor (ER), a member of the superfamily of nuclear receptors. In presence of E_S , ER binds to specific DNA sequences called Estrogen Response Elements (EREs) [1]. These short sequences are usually located in the promoter, although some have been identified in introns or exons [2]. Recently, genome-wide analysis found many functional ER binding sites located at large distances from the transcriptional start site [3-4]. It is well established that ER has the highest affinity for a 15 bp sequence composed of two 6 bp inverted repeats separated by a 3 bp spacer [2, 5]. This sequence, **AGGTCA_{nnn}TGACCT**, is designated as the consensus ERE sequence (ERE_{cs}). The ERE_{cs} sequence is rarely found in natural promoters of E_S -regulated genes; in fact, a multitude of imperfect palindromic-like ERE sequences has been identified as functional EREs. Additionally, by using natural and synthetic imperfect EREs, it has been shown that single nucleotide alteration in each half site of the ERE palindrome affects more the ER binding and its transcriptional activity than if two mutations occur in only one half site of the ERE [2]. Besides, the spacer size between the two half sites also affects the binding affinity and the conformation of the receptor in human estrogen receptor-ERE complex: human estrogen receptors bind strongly to ERE_{cs} exhibiting no spacer or with a spacer size of 3 bp between half-sites. In comparison, the association is much lower with a spacer size of 1 or 2 bp [6].

Vertebrate genomes usually encode two distinct ERs, $ER\alpha$ and $ER\beta$, which significantly differ in their biological activities [7]. In rainbow trout, $ER\alpha$ is present as two isoforms generated by alternative splicing ($rtER_S$ and $rtER_L$) [8]. The $rtER_S$ expression is restricted to the liver where it is the dominant isoform, whereas the $rtER_L$ expression pattern is more ubiquitous, suggesting a specific role of $rtER_S$ in vitellogenesis [9]. Human $ER\alpha$ ($hER\alpha$) and

rtER_S are well-conserved (92% and 60% similarities for the DNA-binding domain and the ligand-dependent transactivation domain, respectively), except for the ligand-independent transactivation domain, which is poorly conserved (20% similarity). hER α and rtER_S also exhibit important functional differences [10]: (i)- rtER_S has a marked transcriptional activity in the absence of estrogens; (ii)- rtER_S needs a 10-fold higher estradiol (E2) concentration to achieve maximal transactivation compared to hER α ; (iii)- rtER_S displays a weaker transactivation activity compared to hER α , in yeast assay with a reporter gene containing one, two or three copies of ERE_{cs}. It is important to note that the binding of E2 to rtER_S, but not to hER α , was shown to be temperature sensitive [11].

Vitellogenin (VTG) is the major precursor of egg yolk proteins which are essential for the early development of oviparous organisms. VTG is produced by the liver of the mature female under the strict control of estrogens. Besides inducing *vtg* genes transcription, Es also increase the stability of the corresponding messenger RNA [12-13]. VTG is then accumulated in the plasma where it can represent up to 80% of seric proteins before uptake by the growing oocyte. Because of their remarkable E2-mediated stimulation, *vtg* genes have for long been the model of choice to decipher the molecular mechanisms of transcriptional regulation. Most of our knowledge of the basic mechanisms of transcriptional regulation is based on *Xenopus laevis* and chicken *vtg* genes [14-17]. Recently, the *tilapia vtg* gene promoter [18] was shown to contain several regions exhibiting more than 70% similarity with the *Xenopus laevis vtgA2* gene promoter. This, together with additional functional analysis [19], suggests that many features of *vtg* gene expression have been conserved through evolution between fish and tetrapods.

VTG are usually encoded by small multigene families without any particular mode of organization. The promoter structure of *vtg* genes is generally quite simple [14-15, 18, 20-21], consisting of a consensus or imperfect EREs plus additional enhancers located close to the

transcriptional start site (TSS). In contrast, the rainbow trout *vtg* (*rtvtg*) genes organization exhibits several unusual features which are apparently shared by most salmonids [12, 22]. There are ~ 20 highly conserved genes, and functional genes, plus 10 truncated pseudogenes for which the truncation breakpoint corresponds to a putative retrotransposon located in intronic sequences. Genes and pseudogenes are located at a single genomic location and are arranged in a head-to-tail orientation, typical of tandemly arrayed genes subject to concerted evolution [23-24]. Repeated units are separated from each other by a highly conserved 4.6 kb intergenic region which is mostly composed of transposable elements (TEs)-related sequences. Strikingly, these sequences are found very close to the TSS, raising the question whether they participate functionally or interfere with *vtg* genes expression.

In this paper, we describe the identification and the physicochemical characterization of a functional imperfect ERE which drives *rtvtg* genes transcription. This *rtvtg*ERE is located in TE-related sequences that compose almost all the promoters of *rtvtg* genes, suggesting that these sequences participate in the regulation of the expression of *vtg* genes and were co-opted during the course of evolution. Therefore, the recent reshaping of the structure and organization of *rtvtg* genes provides us with a unique opportunity to decode the interplay between the evolution of gene structure and the regulation of gene expression.

2. Materials and methods

2.1. Vectors construction

DNA fragments containing putative EREs were obtained by PCR from clone S5 of the *rtvtg* gene [25] and cloned in a luciferase reporter plasmid (pGL2-b, Promega). *MluI* and *BglIII* restriction sites were included in primers to facilitate cloning. DNA was amplified between positions -480 to +22 and -140 to +22, with respect to the transcription initiation site. The PCR products were cloned into the *MluI/BglIII* digested pGL2-b plasmid, giving the p_{-480/+22} and p_{-140/+22} vectors. The resulting plasmids contain the first 21 nucleotides of the *rtvtg* exon 1, in which the ATG (position +18) was mutated (ATA) to prevent interferences with reporter gene. All constructs were controlled by sequencing. pGL2-b (promoterless plasmid) and pGL2-p (SV40 promoter) were used as negative and positive controls respectively.

β -galactosidase reporter vectors are derivatives of the YRPE2 vector, in which 2 ERE_{cs} are located upstream of a minimal *cyc* promoter [26]. A unique *XhoI* site upstream of the 2 ERE_{cs} and a unique *BamHI* in the *lacZ* gene permitted the replacement of this region by appropriate sequences prepared in pBK plasmid (Stratagene). The *cyc-lacZ* sequence was amplified from YRPE2 with primers containing *XhoI-BglIII* sites (forward) and *BamHI* site (reverse) and subcloned into pBK at *XhoI* and *BamHI* sites (pBKcyc). Genomic fragments encompassing the putative EREs were amplified from clone p480 using primers containing *XhoI* (forward) and *BglIII* (reverse) sites. These sequences were subcloned into the *XhoI-BglIII* sites of pBKcyc and *XhoI-BamHI* fragment was used to replace the corresponding fragment in YRPE2. The resulting plasmids were designated Y_{-450/-130}, Y_{-260/-130}, Y_{-210/-130}, Y_{-450/-190} and Y_{-450/-310}. The same strategy was used to construct vectors with a single or no consensus ERE (Y_{EREcs} and Y_{cyc}, respectively).

Yeast rtER_S and hER α expression plasmids (pY60rtER_S and pY60hER α , respectively) are derivatives of pYeDP60-AQPcic [27] from which the cDNA encoding AQPcic was excised by *EcoRI* and *SacI* and replaced by the complete coding sequence of the rtER_S cDNA amplified from pCMV5/rtER_S [28], or the human ER α cDNA amplified from YEPE15 [26]. The plasmid has the yeast ura marker and the bacterial amp^R selection markers. rtER_S and hER α expression is under the control of a GAL10-cyc promoter and can be induced by 2% galactose.

2.2. Cell culture and transient expression assays

MCF-7 human breast cancer cells were seeded at 10⁶ cells per 60 mm dish in phenol red free Dubelco's modified medium and Ham's nutrient mix F12 (DMEM Ham F12) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), 10 U/ml penicillin, 10 μ g/ml streptomycin, 0.0025 μ g/ml amphotericin, 25 mM Hepes and 4.8 mM of bicarbonate. After 24 hours of incubation at 37 °C in this medium (DMEM Ham F12 + 10 % FCS), cells were kept for 12 hours in DMEM Ham F12 plus 5 % dextran coated charcoal stripped FCS (DCC-FCS). MCF-7 cells were then transfected by the calcium phosphate procedure using 5 μ g of reporter plasmids (pGL2-b, pGL2-p, p_{-140/+22} or p_{-480/+22}). The plasmid pCH110 (Pharmacia) containing the β -galactosidase reporter gene was used as an internal control. To improve transfection efficiency, a glycerol shock was performed 6 hours after transfection. Cells were then incubated with DMEM Ham F12 supplemented with 1 % DCC-FCS with or without E2 (10⁻⁸ M). Cells were harvested 36 hours after transfection. Luciferase activity was measured by scintillation counting with the luciferase assay system (Promega), and counts were normalized to levels of β -galactosidase activity. Displayed values are the means of 3 independent experiments.

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells W303.1B (α , leu2, his3, trp1, ura3, ade2-1, can^R, cyr+) were grown in a rich YPRE medium (2% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% raffinose, pH 7 and 3% ethanol) or selective SD medium (0.67% nitrogen base without amino acids, 1% raffinose or 2% glucose, pH 5.8, plus drop out supplements: DO-Ura or DO-Ura-Leu). Yeast cells were transformed with YRPE2-derivative reporter plasmids and/or expression plasmids by the lithium acetate chemical method (Yeast protocols handbook, Clontech). Transformed yeast cells were grown in the selective medium at 170 rpm and 30°C up to $OD_{600nm,l=1cm} = 1$ and diluted 10 times into the YPRE medium. They were grown again to $OD_{600nm,l=1cm} = 0.6$ before induction with 2% galactose, and/or hormonal stimulation with 17 β -estradiol (E2), for 16h. Activity determined by β -galactosidase assays (Yeast protocols handbook, Clontech) was expressed in Miller units according to:

$$Activity = \frac{1000 \times OD_{420nm,l=1cm}}{t \times V \times OD_{600nm,l=1cm}} \quad (1)$$

with t , the time of reaction (min) at 30°C and V the culture volume used for the assay (0.05mL). Displayed values are the means of at least 3 independent experiments. The data of the dose-response curves have been fitted according to the Hill equation from which the recovered value of EC_{50} was extracted:

$$Activity = Activity_{[L] \rightarrow 0} + \frac{a \times [L]^n}{EC_{50} + [L]^n} \quad (2)$$

2.3. *In vitro* binding assays

Double stranded oligonucleotide solutions were prepared from complementary 21 bp-long oligonucleotides synthesized (with labeling or not), purified and adjusted at 100 μ M by the Proligo company (Paris, France). The sense strand of each 21 bp oligonucleotide sequence was labeled with fluorescein at the 5' end. These oligonucleotide sequences are

GTCAGGTCACAGTGACCTGAT (ERE_{cs}), CCCACGTAAAACTGACCATCC (pERE₁), AGTGGGGCAGGTTAACCTAAC (*rtvtgERE*) and CCATTAGACCGTTAGG (mim, a negative control corresponding to a Myb response element). Double stranded oligonucleotides were used at a working concentration of 1 nM. Purified human ER α expressed from baculovirus was provided by PanVera Corporation at a concentration of 3 μ M. One hour before experiments, protein samples were diluted four times in buffer B (10 mM Tris-HCl, 140 mM KCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 10% glycerol) and kept in ice for the duration of the experiments. The experiment could not be carried out with rtERs because we could not produce a functional protein. We note that functional estrogen receptors are notoriously difficult to over-express and purify. Instead of using electro-mobility gel shift assay (EMSA), K_d values have been inferred from anisotropy fluorescence experiments. As opposed to the limited window of experimental conditions available with EMSA (especially pH), fluorescence anisotropy has the considerable advantage of being able probe the physical properties of protein-DNA interaction in a wide range of experimental conditions, and thus providing us with biologically relevant parameters.

Fluorescein fluorescence anisotropy values were monitored with a 480 nm linear polarized excitation light (vertical or horizontal) using a SLM 8100 spectrofluorometer. Fluorescein emission anisotropy (A) was obtained from parallel, $F_{//}$, and perpendicular, F_{\perp} , emission components:

$$A = \frac{F_{//} - F_{\perp}}{F_{//} + 2 \times F_{\perp}} \quad (3)$$

Parallel and perpendicular fluorescence intensities were monitored through a 520 nm cut-off Oriel filter. For each displayed anisotropy value, the solvent contribution was subtracted. Fluorescence anisotropy measurements were carried out with an integration time of 5 sec on each emission component. Each binding curve was performed at 10°C and repeated at least 3

times. The values of the dissociation equilibrium constant (K_D) were inferred by nonlinear least-squares curve fitting using commercial Peakfit software and by assuming that only one equilibrium is observed within the range of protein concentration being used.

3. Results

3.1. The promoter of *rtvtg* genes is composed almost entirely of sequences derived from TEs

In the rainbow trout genome, *vtg* genes are arranged in tandem arrays. They are separated by a 4.6 kb highly conserved intergenic region (Figure 1). Sequence analysis between -1090 and +410 of a *vtg* gene did not reveal blocks of regulatory elements such as those described for the *Xenopus* and chicken genes [14, 17]. No obvious similarity in the organization and sequence of the promoter region was observed between the *rtvtg* and other vertebrate *vtg* genes. This is not surprising considering that most of the 5' region of *rtvtg* genes corresponds to sequences derived from retroelements [29]: the region between positions -1380 and -290 encodes for a truncated reverse transcriptase of a LINE-type retrotransposon (50% similarity with a *jockey* element) whereas the sequence from positions -1495 to -1380 displays 70% similarities with an *env* coding sequence (position 41 to 69, EMBL accession number: U56288) of a HIV-type retrovirus [29]. Additional sequence comparisons carried out with BLASTX against NCBI's databases and REPEATMASKER against a collection of salmonid specific TE sequences (http://lucy.ceh.uvic.ca/repeatmasker/cbr_repeatmasker.py) revealed that the sequence between positions -191 to -107 also shares significant similarities (64%) with the HIV *env* coding sequence (position 176 to 196, EMBL accession number: U56288), strongly suggesting that the *jockey*-like element has been inserted into a retrovirus-like element already present in the *rtvtg* promoter region. In addition, we found that the sequence between -3987 to -2851 is related to a *Salmo salar* LINE-like element (SsaL2.1). Altogether, these data show that almost all the entire intergenic region up to position -107 (which contains the promoter) unambiguously originates from TE-like sequences, leaving a particularly short proximal sequence, putatively corresponding to the ancestral promoter. We note that the TE dynamics and the extent of genomic rearrangement in the intergenic region were much greater

than initially reported [22, 29].

3.2. Putative imperfect ERE located in TE sequences within intergenic region

Sequence analysis of the *rtvtg* promoter revealed no ERE_{cs} but two motifs corresponding to putative imperfect EREs (pERE₁ and pERE₂) within the first ~ 450 bp proximal sequences (Figure 1). An additional motif located, at -220, is composed of two half EREs separated by a single nucleotide spacer and almost certainly does not correspond to a structural and functional ERE [5-6, 30]. Compared to the consensus sequence, the two putative identified EREs, denoted as pERE₁ (ACGTAAaacTGACCA) and pERE₂ (GGGGCAggtTAACCT), exhibit 3 nucleotide differences distributed in the two half sites. Importantly, both putative EREs are located in sequences derived from TEs. Nonetheless, given that half EREs may act in synergism, we cannot rule-out that they functionally participate to the regulation of *rtvtg* genes expression. Therefore, we undertook *in cellulo* and *in vitro* experiments to probe the biological activity of these putative EREs, acting alone or synergistically. To this end, we first tested their ability to induce reporter gene expression in an E2-dependent manner. We then characterized the physical properties of the interactions between putative EREs and ER, with *in vitro* binding experiments.

3.3. A putative ERE exhibits an E2-dependent activity in MCF-7 cells

In order to assess the ability of the region containing the putative EREs to mediate E2-dependent gene induction, the fragments, -480 to +22 and -140 to +22, were inserted in the promoterless plasmid pGL2-b, upstream of the luciferase reporter gene. The resulting plasmids, p_{-480/+22} and p_{-140/+22}, were used to transfect breast cancer MCF-7 cells, which naturally express hER. Luciferase activity was measured with or without E2 treatment (10⁻⁸ M). Control experiments were carried out in similar conditions with MCF-7 cells transfected with pGL2-p vector, containing the SV40 promoter, and showed no E2-dependent activity

(Figure 2). Cells transfected with p_{-140/+22}, devoid of putative ERE, exhibit no significant luciferase activity with and without E2 treatment. Luciferase activities measured with this construct were similar to those of the promoterless pGL2-b vector and thus represent the background level of the assay. Cells transformed with the construct p_{-480/+22}, in absence of E2, also showed a background level of luciferase activity, whereas an increased luciferase activity ($\times \sim 12$) is observed upon E2 stimulation. This result shows that the sequence between -480 and -140 contains a transcriptional enhancer whose activity is dependent on E2.

*3.4. An imperfect ERE is located in TE-like sequences within 480 bp upstream of the transcription start site of *rtvtg**

The functional characterization of the putative EREs was performed by transfection assay in yeast expressing either hER α or rtER γ . We used this simple cell system over human breast cancer cells because it allows to study, in the same cellular context, the properties of two ERs originating from different species (namely human -hER α - and rainbow trout -rtER γ -), towards consensus and imperfect EREs. This system also has the advantage of being appropriate to monitor ligand-dependent transactivation mediated by both ERs [26, 31-32], without the confounding effects of endogenous steroid factors.

Yeast cells were co-transformed with a plasmid expressing ER (pY60ER) under the control of a galactose-inducible promoter and with a β -galactosidase reporter plasmid under the control of one ERE_{cs} (Y_{EREcs}) or various genomic sequences located between -450 and -130 positions from *rtvtg* gene. Five constructs were tested: Y_{-450/-130} containing both pEREs, Y_{-450/-190} and Y_{-450/-310} containing only pERE₁, Y_{-260/-130} and Y_{-210/-130} containing only pERE₂. Cells containing only the reporter construct (*i.e.* without ER expression vector or non-induced expression of ER) exhibited only a basal level of β -galactosidase activity (< 1 Miller unit) with or without E2 treatment (data not shown).

In order to compare the ability of hER α or rtER β to induce reporter gene expression, cells were co-transformed with pY60hER α or pY60rtER β together with the Y_{EREcs} plasmid. ER expression was induced with addition of galactose and activities were measured in absence or in presence of 10^{-7} M of E2 (Figure 3). Preliminary experiments showed that this concentration induced maximal β -galactosidase activity. In absence of E2, only cells expressing rtER β exhibited a significant activity. Following E2-stimulation, β -galactosidase activity was strongly increased for hER α -expressing cells whereas rtER β -expressing cells exhibited an activity increased by twice in comparison to without E2. This control experiment clearly indicates that hER α transcriptional activity is strictly E2-dependent, whereas rtER β exhibits a marked E2-independent activity when acting towards ERE_{cs}, as previously described [8, 10].

The functional analysis of the two putative ERE-like sequences was performed in yeast cells expressing hER α , or rtER β , and transfected with reporter plasmids (Figures 4A and 4B), which contain a single or a combination of the putative ERE sequences identified *in silico*. Yeast cells co-transformed with the expression plasmid and a reporter plasmid containing either no ERE (Y_{cyc}; lane 1) or one ERE_{cs} (Y_{EREcs}; lane 7) were used as negative and positive controls, respectively.

Cells expressing ER (hER α or rtER β) transformed with Y_{-450/-190} (lane 5) or Y_{-450/-310} (lane 6) exhibited only background level of β -galactosidase activity. This result suggests that there is no E2-dependent regulatory sequence within positions -450 and -190 and that pERE₁ plays no direct role in ERs E2-dependent transactivation. In contrast, cells transformed with any of the three constructs containing pERE₂ (Y_{-450/-130}, Y_{-260/-130} or Y_{-210/-130}, lanes 2-4), displayed a strong E2-induced β -galactosidase activity, which can be mediated by both hER α and rtER β . This result indicates that the region between positions -190 and -130 is responsible for E2-stimulation, strongly suggesting that pERE₂ sequence is the active ERE.

3.5. E2 responsiveness of pERE2-containing sequence

We examined the E2 responsiveness of pERE2-containing sequence with dose-response curves carried out with yeast cells transformed with the reporter plasmids, Y_{EREcs} (positive control) or Y_{-210/-130} (containing pERE2) or Y_{-450/-310} (containing the non E2-responsive pERE₁ as a negative control), together with hER α or rtER_S expression plasmid (Figure 5 and Table 1). As expected, the Y_{-450/-310} construct did not yield significant levels of β -galactosidase activity, whatever E2 concentration. In contrast, the Y_{EREcs} and Y_{-210/-130} constructs responded strongly to E2, with hER α or rtER_S. Indeed, the EC₅₀ (that is, the concentration of E2 corresponding to 50% of the maximal response) is very similar for both ERs, although the EC₅₀ measured with Y_{-210/-130} is consistently 4.5 times higher than that of Y_{EREcs} (3.1 and 14.2 vs 4.1 and 18.5 with Y_{EREcs} and Y_{-210/-130} constructs, respectively).

In agreement with previous reports [10-11], we found marked functional differences between hER α and rtER_S: (i)- the maximal level of reporter activity of the Y_{-210/-130} construct with rtER_S is only half that of hER α (~ 63 vs ~ 135 Miller units), and (ii)- rtER_S (but not hER α) displays a strong level of background expression (~ 100 Miller units) without E2 treatment, implying that it has a high E2-independent biological activity. Likewise, the induction factor mediated by rtER_S is much lower than that of hER α (rtER_S : 17.0 and 10.3 vs hER α : 2.4 and 4.2, with Y_{EREcs} and Y_{-210/-130} constructs, respectively), despite the fact that maximal induction levels measured with the control construct (Y_{EREcs}) are comparable for hER α and rtER_S and they are reached at similar E2 concentration. These differences have important physiological implications which will be discussed below. Nonetheless, these results show that despite functional differences between hER α and rtER_S, the genomic region between -210 and -130 consistently drives an E2-dependent transcriptional induction. Given that this genomic region contains a single ERE-like motif, we speculate that pERE₂ corresponds to a functional ERE.

3.6. ER specifically binds to the pERE2

The physical properties of the interactions between ER and the different putative EREs (pERE₂, pERE₁, ERE_{cs} or mim, a nonspecific sequence) was inferred from fluorescence anisotropy DNA binding curves. This technology is remarkably sensitive and robust for measuring protein-DNA equilibrium constants [33-36]. We carried out titration curves with purified recombinant hER α but not with rtER_s, since we could not produce biologically active proteins, despite the use of several over-production and purification systems. These fluorescence anisotropy measurements were performed by using a fixed concentration of fluorescein-labelled oligonucleotides (1.0 nM) and various amounts of hER α , at 140 mM KCl. Different oligonucleotide sequences have been used: ERE_{cs}, pERE₂, pERE₁ and mim. Data were fitted to recover the equilibrium dissociation constant (K_D). The fluorescence anisotropy binding curve of the hER α -ERE_{cs} complex provides an estimated K_D value of 3.0 ± 0.4 nM (Figure 6A). Strikingly, a K_D value 2-fold higher (6.2 ± 0.3 nM) was observed with pERE₂ (Figure 6B). Thus, at 140 mM KCl, hER α exhibits a similar affinity for the consensus ERE and for the natural pERE₂ sequence. Furthermore, with ERE_{cs} and pERE₂, anisotropy values increased twice following hER α -ERE complex formation, implying that the stoichiometry of the complex is the same in both cases. In contrast, the binding curve obtained with pERE₁ sequence was similar to that obtained with mim, indicating that hER α is unable to bind specifically to this sequence, thus confirming the fact that it is not a functional ERE.

These results unambiguously show that hER α specifically binds to the pERE₂ sequence with an affinity close to the value displayed for ERE_{cs}, confirming E2-regulatory element within the genomic region between -210 and -190 is pERE2. As pERE₂ appears as the main and unique ERE sequence inside *rtvtg* promoter, this sequence will refer to as *rtvtg*ERE from now on.

4. Discussion

4.1. A functional ERE resides in transposable element sequences

Sequence analysis of the *rtvtg* promoter revealed two putative imperfect EREs in the region between -480 and -140, relative to the TSS. This *in silico* analysis is based on well known ERE sequences: the canonical ERE inverted repeat AGGTCAnnnTGACCT, the direct repeat AGGTCAn_(>10bp)AGGTCA, the inverted repeat TGACCTnnnAGGTCA, a half ERE flanked by an AT rich region and the ERE variants found in Alu sequences (an imperfect ERE palindrome 9 bp upstream of a perfect ERE half-site) [2 and ref. therein]. There are two putative ERE inverted repeat sequences in the proximal promoter: ACGTAAaacTGACCA and GGGGCaggTAAACCT. The TGGACA_tTGATCT sequence, found in the region, is composed of two imperfect half-sites separated by a single base pair. Therefore, it cannot correspond to a functional ERE [5-6, 30]. Since *in silico* sequence analysis tends to predict large numbers of putative EREs, of which only a fraction displays some biological activity, it is necessary to validate their biological activity experimentally. To this end, we probed the biological properties of ERE candidates *in cellulo* and *in vitro*.

The E2-dependent enhancer activity of the sequence spanning positions -480 to +22 of the *rtvtg* gene was first tested with a reporter assay in MCF-7 cells, a breast cancer cell line that stably express hER. This is a well-established model system which has been used to characterize the regulation of gene expression by E_s, *e.g.* the identification of EREs controlling the expression of *Xenopus*, chicken and *tilapia vtg* genes [16, 35]. Our constructs include the natural proximal 5'-flanking sequence with the TATA box (TTAAAA) and 22 bp of 5' untranslated sequences of the *rtvtg* gene. The transient transfection assays indicate that a functional element driving E2-induced transcription is located between positions -480 and -140.

We next assessed the enhancer activity of this genomic region in yeast, with pY60ER and YRPE2-derivatives plasmids. This convenient cellular system has long proved instrumental for the characterization of the rtER, the promoter of several E_S-inducible genes and to screen the estrogenic-potency of xenobiotics [6, 8, 29, 36]. This analysis restricted the position of the E2-dependent enhancer to a short region located between positions -130 and -190 from the TSS. This is an indication that the pERE₂ motif, located at position -180, may correspond to the enhancer. In contrast, the pERE₁ motif exhibits no biological activity, thus confirming that it is not a functional ERE. Strikingly, the pERE₂ sequence (GGGGCaggTAACT) differs from the ERE_{cs} (AGGTCAnnnTGACCT) by two and one mutations, in the first and second half-sites, respectively. This motif has partially lost its palindromy and features one of the most degenerated functional ERE motifs ever identified. Interestingly, recent genomic data suggest that binding of ER to degenerated ERE motifs is in fact quite common [37].

We used *in vitro* DNA binding assay to address whether hER α specifically binds to the pERE₂ sequence. We show that, in our experimental conditions, hER α specifically binds to the pERE₂ sequence with a very high affinity, but not to the pERE₁ sequence. In agreement with previous work *in vitro*, we found that hER α has a slightly lower affinity for a degenerated ERE (pERE₂) compared to ERE_{cs} [2, 37], although in the case of pERE₂, it is only two fold lower. At higher salt concentration, hER α is known to display a much stronger preference for ERE_{cs} over degenerated EREs [33, 38], ensuring dynamic interactions and the fast biological responses. This should have strong physiological implication and might explain the frequent occurrence of degenerated EREs in promoter sequences.

As a whole, our results show that the pERE₂ sequence, now designated *rtvtg*ERE, is the functional element driving the E2-dependent *rtvtg* genes transcription.

4.2. Functional impact of ERE_{cs} and $rtvtgERE$: The driving force of $rtvtg$ genes evolution?

Paradoxically, even though the ERE_{cs} is the optimal ER DNA binding site and mediates the strongest transcriptional induction, it is found in less than 10% of E_S -responsive genes [2]. Instead, imperfect motifs, rather than ERE_{cs} , seem to have been selected in the course of evolution. Thus, comparing the biological activity of the various ERE sequences might provide some clues about the mechanisms of transcriptional regulation mediated by E_S and their physiological relevance. In absence of E2, a promoter construct containing an ERE_{cs} separated by 20 bp is sufficient to drive the transcription of the reporter gene with $rtER_S$. This strong E2-independent basal activity has already been observed in various cell systems (including yeast) and is assigned to the absence of the N-terminal domain [8, 10, 39]. In presence of E2, transcription is further increased by 2.4 fold with construct containing one ERE_{cs} . $rtER_S$ is therefore an efficient basal transcriptional activator which weakly responds to E2 when bound to an ERE_{cs} . In sharp contrast, $rtER_S$ displays a much lower basal transcriptional activity but a high responsiveness to E2, when it is bound to $rtvtgERE$. This point has important physiological consequences because E2-responsive genes will be properly expressed in the liver, where the $rtER_S$ isoform dominates, only if they are under the control of imperfect EREs (such as $rtvtgERE$), not ERE_{cs} .

One might argue that the level of transcriptional induction driven by $rtER_S$ is too weak to account for the dramatic induction of $rtvtg$ genes [40]. However, given that rainbow trout VTGs are encoded by ~20 (almost) identical genes, even a modest induction could be amplified by the large number of $rtvtg$ genes. This functional hypothesis fits remarkably well with the current model of $rtvtg$ genes evolution [22], in which the weak expression of an ancestral $rtvtg$ gene would have been compensated by series of tandem amplification (see below). Therefore, the work presented here provides key molecular and functional clues for

our understanding of *rtvtg* genes evolution and the interplay between the transposable elements and the evolution of genes regulation (see below).

4.3. Co-opted transposable elements and (non)evolution of gene regulation

Vtg genes structure and organization in rainbow trout are the result of a complex evolutionary process [22]. Our new structural and functional data support well the current model of *rtvtg* genes evolution, which proposes that the promoter of an ancestral *rtvtg* gene was disrupted by the insertion of two retrotransposons, resulting in reduced transcription levels. Subsequently, this weak expression level would have been rescued by local gene amplification, promoting the rise of the present-day genes organization. Given that VTG synthesis is restricted to the liver and strictly controlled by E2, this model implies that the functional impact of the TE sequences was limited to a reduction of the *rtvtg* transcription level, with little or no effect on its expression pattern and timing. Indeed, VTG synthesis mobilizes considerable resources and improper expression would have been severely counter-selected; no evidence of ectopic expression of VTG has been found so far. Perhaps surprisingly, we found that a key regulatory element resides in the remnants of TE sequences. This indicates that despite initiating the disruption of the ancestral promoter, they also contributed to restore the proper regulation of the *rtvtg* genes expression. Thus, TE sequences provided both the plague and the cure.

The fact that gene expression may be influenced by EREs located nearby TE sequences is not new, since it has already been described for the androgen receptor gene [41], the ApoA gene [42] and the BRCA-1 gene [43]. In these cases, TEs are likely to have significantly contributed to the evolution of the gene expression profiles by providing novel regulatory sequences.

In the case of *rtvtg* genes, however, they did not provide additional enhancers responding to new regulation pathways, but rather they provided regulatory elements helping to keep a similar expression profile. Thus, although they are usually regarded as a source of genomic and functional innovations, in the case of *rtvtg* genes, they may have acted instead as some kind of regulatory buffers, in order to preserve the proper expression of a protein of vital importance for egg survival and reproduction.

The fate of TEs in genomes is dictated by a delicate balance between opposite evolutionary forces: On one hand, they can be maintained by genetic drift, high transposition rate or because they provide some advantageous character. On the other hand, they can be purged by stochastic loss, their genetic burden (by selection) or self inactivation, to name a few [44]. Although their propensity to alter gene regulation plays an important role in genome expression dynamics, it also increases their genetic burden since they can drive the cell into aberrant transcriptional programs. Thus, the potential to buffer alterations of the transcriptional networks might balance the genetic burden associated with their biological activity and may represent a powerful strategy to secure their fate in genomes.

Acknowledgements

This work was supported by Le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Le Comité du Morbihan de la Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors are grateful to J. Bouma and J. Nagler (University of Idaho, USA) and to F. Chesnel (UMR 6061, Université de Rennes 1) for their technical help. The authors also thank Pr. O'Malley for the gift of the YRPE2 vector.

References

- [1] R.M. Evans, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* 240 (1988) 889-895.
- [2] C.M. Klinge, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 2905-2919.
- [3] Y.F. Pan, K.D. Wansa, M.H. Liu, B. Zhao, S.Z. Hong, P.Y. Tan, K.S. Lim, G. Bourque, E.T. Liu, E. Cheung, Regulation of estrogen receptor-mediated long range transcription via evolutionarily conserved distal response elements, *J Biol Chem* 283 (2008) 32977-32988.
- [4] F. Parisi, B. Sonderegger, P. Wirapati, M. Delorenzi, F. Naef, Relationship between estrogen receptor alpha location and gene induction reveals the importance of downstream sites and cofactors, *BMC Genomics* 10 (2009) 381.
- [5] C.J. Gruber, D.M. Gruber, I.M. Gruber, F. Wieser, J.C. Huber, Anatomy of the estrogen response element, *Trends Endocrinol Metab* 15 (2004) 73-78.
- [6] S. El Marzouk, R. Gahattamaneni, S.R. Joshi, W.M. Scovell, The plasticity of estrogen receptor-DNA complexes: binding affinity and specificity of estrogen receptors to estrogen response element half-sites separated by variant spacers, *J Steroid Biochem Mol Biol* 110 (2008) 186-195.
- [7] H.A. Harris, Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies, *Mol Endocrinol* 21 (2007) 1-13.
- [8] F. Pakdel, R. Metivier, G. Flouriot, Y. Valotaire, Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene, *Endocrinology* 141 (2000) 571-580.
- [9] A. Menuet, I. Anglade, G. Flouriot, F. Pakdel, O. Kah, Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout, *Biol Reprod* 65 (2001) 1548-1557.
- [10] F. Petit, Y. Valotaire, F. Pakdel, Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur J Biochem* 233 (1995) 584-592.
- [11] J.B. Matthews, J.H. Clemons, T.R. Zacharewski, Reciprocal mutagenesis between human alpha (L349, M528) and rainbow trout (M317, I496) estrogen receptor residues

- demonstrates their importance in ligand binding and gene expression at different temperatures, *Mol Cell Endocrinol* 183 (2001) 127-139.
- [12] G. Flouriot, H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck, F. Gannon, Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1, *EMBO J* 19 (2000) 4688-4700.
- [13] M. Saceda, R.K. Lindsey, H. Solomon, S.V. Angeloni, M.B. Martin, Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability, *J Steroid Biochem Mol Biol* 66 (1998) 113-120.
- [14] J.B. Burch, M.I. Evans, T.M. Friedman, P.J. O'Malley, Two functional estrogen response elements are located upstream of the major chicken vitellogenin gene, *Mol Cell Biol* 8 (1988) 1123-1131.
- [15] J.B. Burch, A.H. Fischer, Chromatin studies reveal that an ERE is located far upstream of a vitellogenin gene and that a distal tissue-specific hypersensitive site is conserved for two coordinately regulated vitellogenin genes, *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 4157-4165.
- [16] D.L. Davis, J.B. Burch, The chicken vitellogenin II gene is flanked by a GATA factor-dependent estrogen response unit, *Mol Endocrinol* 10 (1996) 937-944.
- [17] L. Klein-Hitpass, M. Schorpp, U. Wagner, G.U. Ryffel, An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells, *Cell* 46 (1986) 1053-1061.
- [18] B.Y. Teo, N.S. Tan, E.H. Lim, T.J. Lam, J.L. Ding, A novel piscine vitellogenin gene: structural and functional analyses of estrogen-inducible promoter, *Mol Cell Endocrinol* 146 (1998) 103-120.
- [19] B.Y. Teo, N.S. Tan, T.J. Lam, J.L. Ding, Synergistic effects of nuclear factors--GATA, VBP and ER in potentiating vitellogenin gene transcription, *FEBS Lett* 459 (1999) 57-63.
- [20] L. Klein-Hitpass, M. Kaling, G.U. Ryffel, Synergism of closely adjacent estrogen-responsive elements increases their regulatory potential, *J Mol Biol* 201 (1988) 537-544.
- [21] E. Martinez, W. Wahli, Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity, *EMBO J* 8 (1989) 3781-3791.

-
- [22] N. Buisine, V. Trichet, J. Wolff, Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes, *Mol Genet Genomics* 268 (2002) 535-542.
- [23] D. Liao, Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications, *Am J Hum Genet* 64 (1999) 24-30.
- [24] D. Liao, T. Pavelitz, J.R. Kidd, K.K. Kidd, A.M. Weiner, Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion, *EMBO J* 16 (1997) 588-598.
- [25] N. Mouchel, V. Trichet, B.Y. Naimi, J.P. Le Pennec, J. Wolff, Structure of a fish (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin gene and its evolutionary implication, *Gene* 197 (1997) 147-152.
- [26] D.P. McDonnell, Z. Nawaz, C. Densmore, N.L. Weigel, T.A. Pham, J.H. Clark, B.W. O'Malley, High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Steroid Biochem Mol Biol* 39 (1991) 291-297.
- [27] V. Lagree, I. Pellerin, J.F. Hubert, F. Tacnet, F. Le Caherec, N. Roudier, D. Thomas, J. Gouranton, S. Deschamps, A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in *Xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes, *J Biol Chem* 273 (1998) 12422-12426.
- [28] F. Pakdel, F. Petit, I. Anglade, O. Kah, F. Delaunay, T. Bailhache, Y. Valotaire, Overexpression of rainbow trout estrogen receptor domains in *Escherichia coli*: characterization and utilization in the production of antibodies for immunoblotting and immunocytochemistry, *Mol Cell Endocrinol* 104 (1994) 81-93.
- [29] V. Trichet, N. Buisine, N. Mouchel, P. Moran, A.M. Pendas, J.P. Le Pennec, J. Wolff, Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity, *Mol Gen Genet* 263 (2000) 828-837.
- [30] K. Pettersson, K. Grandien, G.G. Kuiper, J.A. Gustafsson, Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha, *Mol Endocrinol* 11 (1997) 1486-1496.
- [31] D. Metzger, J.H. White, P. Chambon, The human oestrogen receptor functions in yeast, *Nature* 334 (1988) 31-36.
- [32] T.A. Pham, Y.P. Hwung, D. Santiso-Mere, D.P. McDonnell, B.W. O'Malley, Ligand-dependent and -independent function of the transactivation regions of the human estrogen receptor in yeast, *Mol Endocrinol* 6 (1992) 1043-1050.

- [33] M. Boyer, N. Poujol, E. Margeat, C.A. Royer, Quantitative characterization of the interaction between purified human estrogen receptor alpha and DNA using fluorescence anisotropy, *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 2494-2502.
- [34] V. Le Tilly, C. Royer, Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding, *Biochemistry* 32 (1993) 7753-7758.
- [35] M.S. Ozers, J.J. Hill, K. Ervin, J.R. Wood, A.M. Nardulli, C.A. Royer, J. Gorski, Equilibrium binding of estrogen receptor with DNA using fluorescence anisotropy, *J Biol Chem* 272 (1997) 30405-30411.
- [36] L. Zargarian, V. Le Tilly, N. Jamin, A. Chaffotte, O.S. Gabrielsen, F. Toma, B. Alpert, Myb-DNA recognition: role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-Myb, *Biochemistry* 38 (1999) 1921-1929.
- [37] A.S. Cheng, V.X. Jin, M. Fan, L.T. Smith, S. Liyanarachchi, P.S. Yan, Y.W. Leu, M.W. Chan, C. Plass, K.P. Nephew, R.V. Davuluri, T.H. Huang, Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters, *Mol Cell* 21 (2006) 393-404.
- [38] A. Bouter, V. Le Tilly, O. Sire, Interplay of flexibility and stability in the control of estrogen receptor activity, *Biochemistry* 44 (2005) 790-798.
- [39] R. Metivier, F.G. Petit, Y. Valotaire, F. Pakdel, Function of N-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential alpha-helical structure and is negatively regulated by the A domain, *Mol Endocrinol* 14 (2000) 1849-1871.
- [40] C. Vaillant, C. Le Guellec, F. Pakdel, Y. Valotaire, Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes, *Gen Comp Endocrinol* 70 (1988) 284-290.
- [41] C. Ramakrishnan, D.M. Robins, Steroid hormone responsiveness of a family of closely related mouse proviral elements, *Mamm Genome* 8 (1997) 811-817.
- [42] Z. Yang, D. Boffelli, N. Boonmark, K. Schwartz, R. Lawn, Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element, *J Biol Chem* 273 (1998) 891-897.
- [43] J. Norris, D. Fan, C. Aleman, J.R. Marks, P.A. Futreal, R.W. Wiseman, J.D. Iglehart, P.L. Deininger, D.P. McDonnell, Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers, *J Biol Chem* 270 (1995) 22777-22782.
- [44] C. Feschotte, E.J. Pritham, DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes, *Annu Rev Genet* 41 (2007) 331-368.

Figure legends

Fig. 1. The intergenic region separating the tandemly arrayed *rtvtg* genes is mostly composed of transposable elements. The 3'-end of a gene (exons 33-35) and the 5'-end of the next gene (exons 1-3) are shown with *black boxes*. The intergenic region is 4.6 kb long and numbered relative to the transcription start site of the downstream *rtvtg* gene (+1). Sequences shown with *stippled boxes* are remnants of retrotransposable elements (*Gypsy*-like, *LINE*-like and *Jockey*-like). A short sequence analogous to a HIV *env* gene (*H*) has been disrupted by the insertion of the *Jockey*-like sequence. The *Jockey*-like sequence corresponds to a reverse transcriptase domain and the *Gypsy*-like sequence shows typical features of protease and reverse transcriptase domains of Pol polyproteins. Putative EREs (pERE1 and pERE₂) and half EREs motifs are shown.

Fig. 2. *rtvtg* gene promoter activity in MCF-7 cells. Cells were transfected with plasmids containing the luciferase reporter under no promoter (pGL2-b), the SV40 promoter (pGL2-p) or different regions of the 5'-end of the *rtvtg* gene. Constructs are shown on the left side. On top, a schematic representation of the *rtvtg* 5'-region indicates the positions of putative EREs. The respective promoter activities in absence (-E2) and presence (+E2) of 17 β -estradiol are shown in the histogram on the right. Values are the average of three biological replicates.

Fig. 3. E2-dependent enhancer activity of hER α and rtER_S in *Saccharomyces cerevisiae*. Cells were co-transformed with pY60hER α (black bar charts) or pY60rtER_S (grey bar charts) expression vector and the β -galactosidase reporter vector Y_{ERECS}. The recombinant cells were grown in a YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and then induced with 2% of galactose and stimulated or not with 10^{-7} M of E2. After 16h of incubation, β -galactosidase activity was measured. Values represented a mean of at least three independent experiments.

Fig.4. An ERE is located in the *rtvtg* gene promoter: functional analysis using hER α (A) and rtER β (B). Yeast cells were co-transformed with the pY60ER expression vector and one of the YRPE2-derivatives reporter vectors: Y_{cyc} (lane 1), Y_{-450/-130} (lane 2), Y_{-260/-130} (lane 3), Y_{-210/-130} (lane 4), Y_{-450/-190} (lane 5), Y_{-450/-310} (lane 6) and Y_{EREcs} (lane 7). The recombinant cells were grown in a YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and then induced with 2% of galactose and stimulated (+E2) with 10^{-7} M of E2 or not (-E2). After 16h of incubation, β -galactosidase activity was measured. Values represented a mean of at least three independent experiments.

Fig. 5. Functional analysis of the putative EREs and functional differences between hER α and rtER β . Dose-response curves were carried out with yeast cells co-transformed with an ERE reporter plasmids (Y_{EREcs} ●, Y_{-210/-130} ▲ or Y_{-450/-310} ■) and an ER expression vector (pY60hER α or pY60rtER β). Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose and treated with different E2 concentrations. β -galactosidase activity was measured after 16h induction. Values represented a mean of at least three independent experiments.

Fig. 6. ER has a strong affinity for *rtvtg*ERE. Fluorescence anisotropy was measured at low salt concentration. Titration of 1 nM fluorescein-labeled 21-mer with hER α . Lines through the data are the result of the best fit (simple binding model) through non-linear regression. Panel **A**: ERE_{cs} (●) and non-specific oligonucleotide targets, mim (□); Panel **B**: *rtvtg*ERE (▲) and pERE₁ (Δ). The inferred K_D values are 3.0 ± 0.4 nM, 6.2 ± 0.3 nM and > 40 nM for ERE_{cs}, *rtvtg*ERE and non-specific sequences (pERE₁ and mim), respectively. Experiments are performed at 10 ± 2 °C in 10 mM Tris HCl, 140 mM KCl, pH 7, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol.

Table

Table 1. EC50 values and induction factor following E2 treatment. The EC₅₀ values were determined from the *in cellulo* dose-response assays using non linear regression with a sigmoid curve fitting (see Material and Methods section). The Activity $_{[L] \rightarrow \max}$ is the β -galactosidase activity measured with the maximal E2 concentration used (10^{-7} mol.L⁻¹). E2 stimulation factor was calculated as ratio of β -galactosidase activities measured in the presence of 10^{-7} mol.L⁻¹ of E2 and in the absence of hormonal stimulation.

		EC ₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	Activity $_{[L] \rightarrow \max}$ (Miller units)	E2 Induction Factor
hERα	Y_{EREcs}	3.1 \pm 1.2	224.6 \pm 16.7	17.0 \pm 2.4
	Y_{-210/-130}	14.2 \pm 2.8	135.1 \pm 7.1	10.3 \pm 0.9
rtER_S	Y_{EREcs}	4.1 \pm 1.0	216.8 \pm 14.0	2.4 \pm 0.4
	Y_{-210/-130}	18.5 \pm 4.5	66.3 \pm 10.9	4.2 \pm 0.9

Figures

Fig. 1

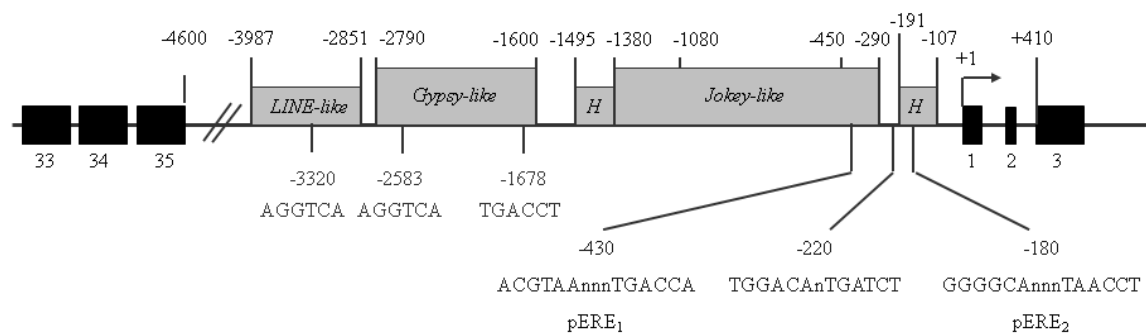


Fig. 2

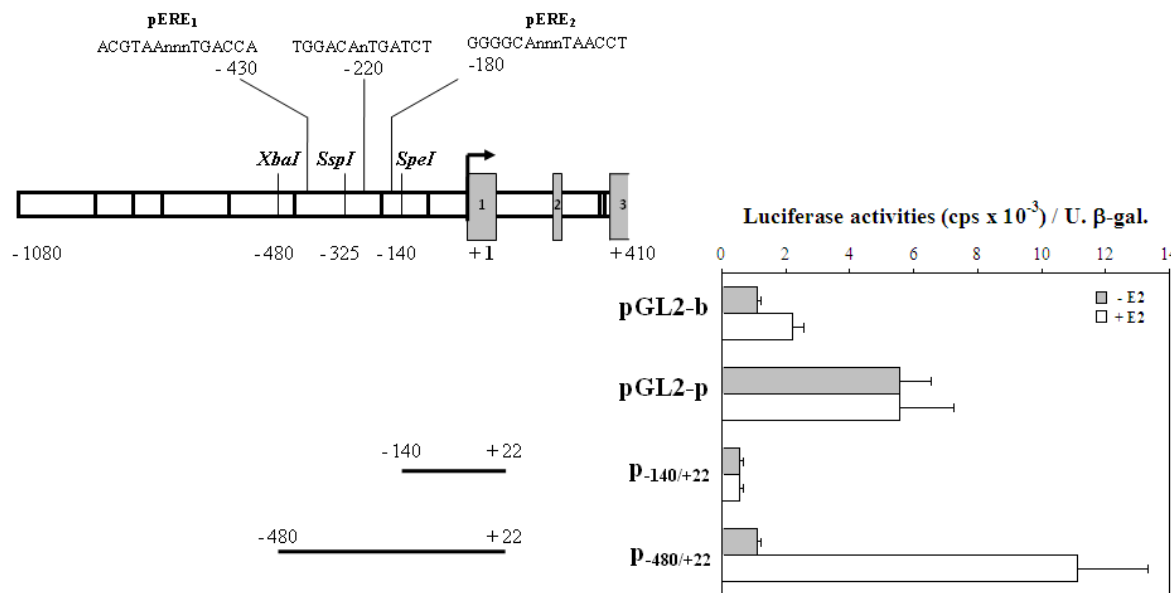


Fig. 3

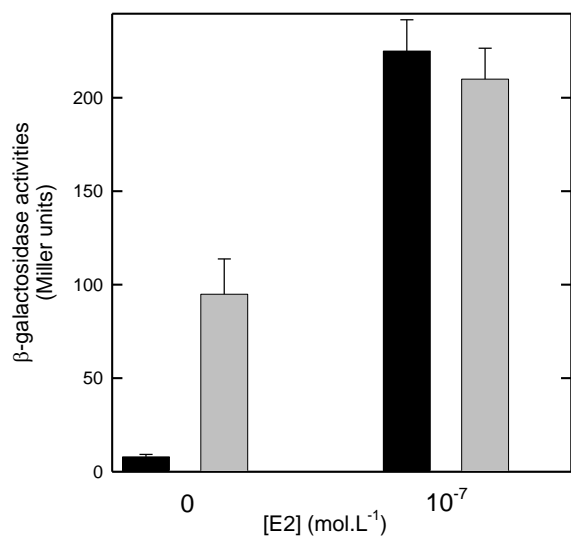


Fig. 4

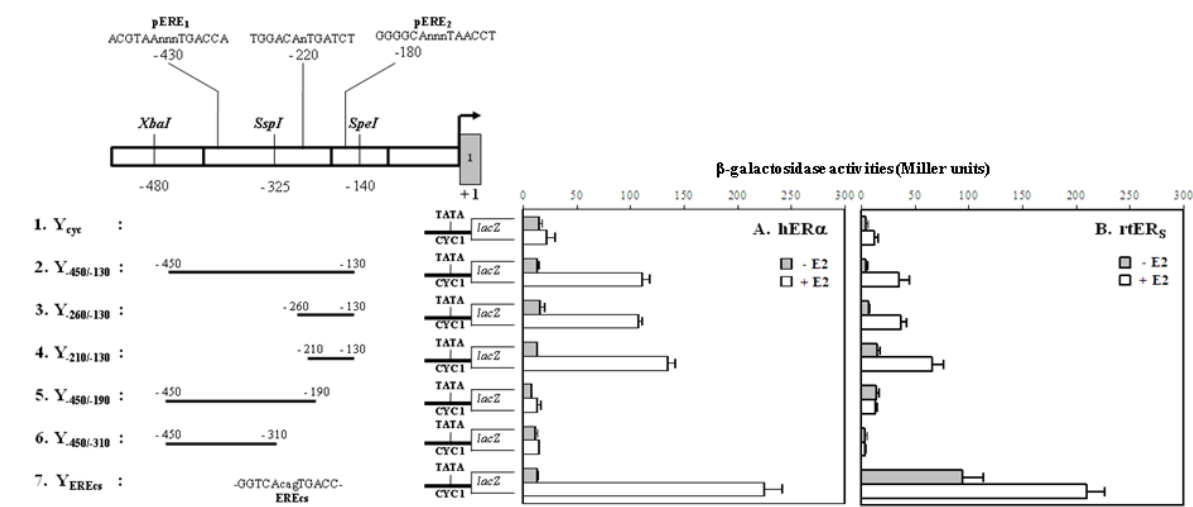


Fig. 5

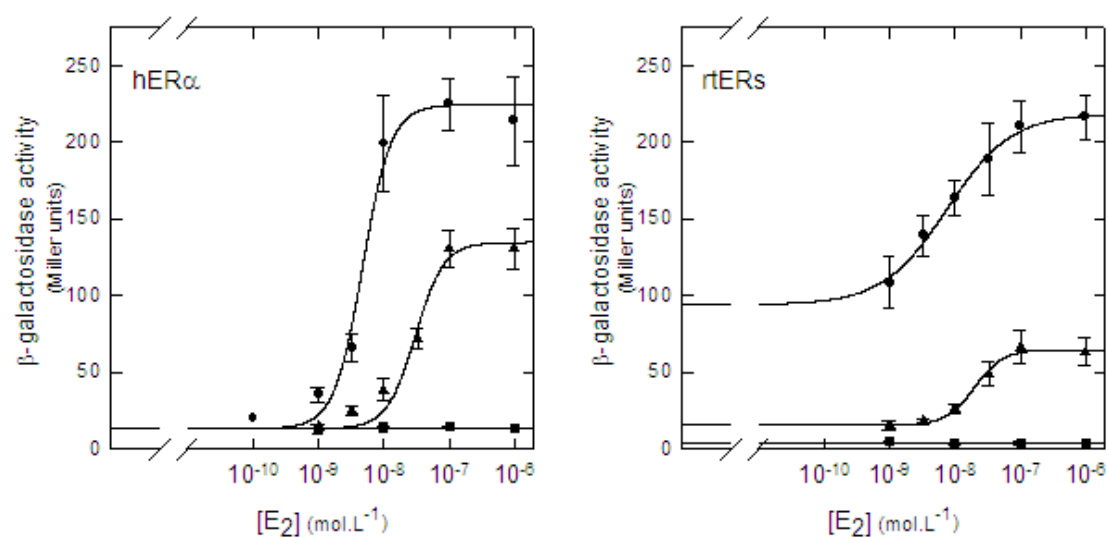
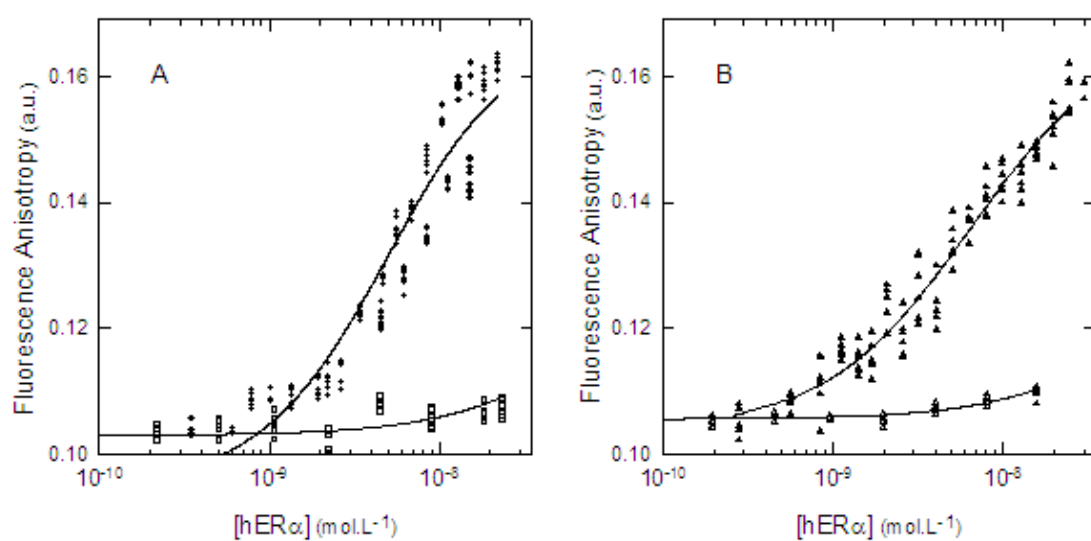


Fig. 6



I.2 Résultats complémentaires de l'article 1 : Effet de l'insertion d'un second ERE dans le promoteur

Afin de connaître l'impact de la présence de deux séquences ERE dans le promoteur des gènes œstrogéno-sensibles, nous avons réalisé des courbes dose-réponse (Figure 26). A cette fin, nous avons mesuré l'activité cellulaire de hER α et rtER β via des mesures de l'activité β -galactosidase en fonction de la concentration en œstrogènes dans des levures transformées par un vecteur rapporteur contenant, dans la région promotrice du gène *LacZ*, un ou deux ERE $_{cs}$, respectivement Y $_{EREcs}$ et YRPE2. Nous avons ainsi comparé les EC $_{50}$ (concentration en E2 nécessaire pour observer 50% de l'activité maximale) ainsi que les activités cellulaires maximales des deux récepteurs. Nous observons des réponses des 2 ER différentes : quelle que soit la concentration en E2, hER α présente une activité cellulaire plus importante en présence de 2 ERE $_{cs}$ alors que celle de rtER β est très peu modulée.

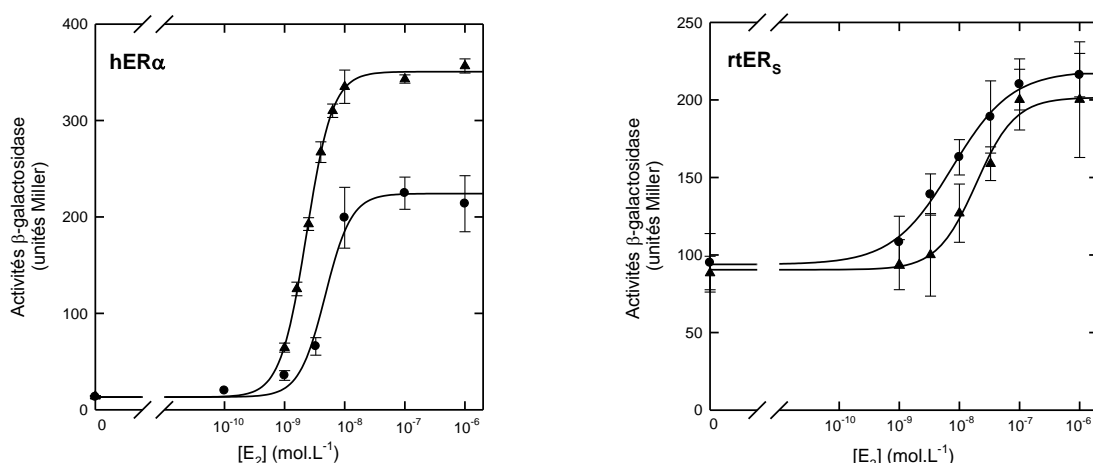


Figure 26 : Courbes Dose-réponse réalisées sur des levures transformées par le vecteur rapporteur contenant une ou deux séquences ERE $_{cs}$.

Les levures *S. cerevisiae* ont été co-transformées par les vecteurs d'expression pY60her α ou pY60rter β et un vecteur rapporteur : Y $_{EREcs}$ (●) et YRPE2 (▲) contenant respectivement un et deux ERE $_{cs}$. Les données ont été fittées par l'équation de Hill qui permet l'extraction des paramètres suivants : EC $_{50}$ et Activité cellulaire à concentration maximale en ligands (Activité [L] \rightarrow max).

Les courbes dose-réponse obtenues sont analysées par l'équation de Hill. De cette analyse, nous pouvons extraire les paramètres suivants (récapitulés dans le Tableau 10) : valeur des EC $_{50}$, activités cellulaires mesurées en présence de la concentration maximale en E2 utilisée, soit 10 $^{-6}$ mol.L $^{-1}$, et le facteur de stimulation hormonale. Nous montrons que la présence d'une seconde séquence ERE $_{cs}$ en amont du gène *LacZ* a pour conséquence d'augmenter l'activité

cellulaire de hER α , et par conséquent son facteur de stimulation hormonale, d'un facteur d'environ 1,5 sans modifier l'EC₅₀. En revanche, nos expériences indiquent que l'activité cellulaire de rtER_S n'est pas modulée par la présence de plusieurs ERE. Néanmoins, ce récepteur présente une EC₅₀ vis-à-vis de E₂ dépendante du nombre de séquences EREcs dans le promoteur.

Tableau 10 : Comparaison des valeurs des EC₅₀ et des facteurs de stimulation hormonale obtenus en présence d'un ou deux EREcs.

Les expériences de dose-réponse sont réalisées sur des levures co-transformées par le plasmide d'expression pY60her α ou pY60rters et le vecteur rapporteur contenant un ou deux ERE_{cs} : Y_{EREcs} et YRPE2. Les données sont analysées selon l'équation de Hill permettant ainsi d'extraire pour chaque condition, la valeur de l'EC₅₀ et l'activité β -galactosidase obtenues en présence de la concentration maximale en E₂ (10⁻⁷ mol.L⁻¹). Le facteur de stimulation hormonale correspond au ratio des activités β -galactosidase en présence de 10⁻⁷ mol.L⁻¹ en E₂ et en absence de stimulation hormonale.

		EC ₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	Activité [L]→max (unités Miller)	Facteur de stimulation hormonale
hER α	Y _{EREcs}	3,1 ± 1,2	224,6 ± 16,7	17,0 ± 2,4
	YRPE2	2,3 ± 0,4	350,9 ± 3,3	25,8 ± 1,1
rtER _S	Y _{EREcs}	4,1 ± 1,0	216,8 ± 14,0	2,4 ± 0,4
	YRPE2	22,8 ± 6,0	201,6 ± 23,3	2,0 ± 0,2

I.3 Discussion du chapitre 1

Le gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel est connu pour être induit par l'œstradiol mais jusqu'ici, aucune séquence ERE n'a été identifiée dans son promoteur. Par des outils de bioinformatique, de biologie moléculaire, cellulaire et de biophysique, nous avons pu mettre en évidence que la séquence GGGGCAnnnTAACCT localisée à - 180 pb du site d'initiation de la transcription correspondait à une séquence ERE imparfaite. Cette séquence diffère du consensus par trois paires de bases (nucléotides soulignés) : deux dans le premier demi-site et une dans le second. La présence de cette séquence dans la région promotrice du gène *Luc* suffit à l'induction de son expression dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 exprimant le récepteur aux œstrogènes humain. De plus, nous montrons que cette séquence permet la *trans*-activation d'un gène rapporteur chez *S. cerevisiae* en présence de hER α comme de rtER_S. L'ERE imparfait ainsi identifié est appelé *rtvtgERE*. D'autre part, nos

résultats obtenus par des mesures d'anisotropie de fluorescence montrent que hER α se fixe spécifiquement à *rtvtgERE* avec une affinité deux fois plus faible que s'il s'agissait d'un ERE_{cs} mais elle reste tout de même élevée.

La conséquence de la présence d'un ERE dégénéré par rapport à un ERE consensus dans la région promotrice du gène rapporteur est une activité cellulaire plus faible du récepteur et, dans le cas du rtER_s, un facteur de stimulation hormonale plus élevé. Ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse d'une surproduction contrôlée de vitellogénine. En effet, la stimulation par E2 aurait tout d'abord pour conséquence de surproduire le rtER_s puisque la séquence ERE retrouvée dans la région promotrice de son gène ne montre qu'un seul nucléotide divergent de la séquence consensus, ce qui impliquerait une plus forte affinité comparée à *rtvtgERE*. Une fois que le taux cellulaire de récepteur ait atteint un certain seuil, la *trans*-activation des 20 gènes de la vitellogénine peut alors se produire. On voit alors que la faible activité cellulaire et la plus faible sensibilité vis-à-vis de E2 observées ne constituent pas un désavantage du fait de la forte amplification du gène vitellogénine.

Très souvent, les gènes ne sont pas régulés par un seul ERE mais par plusieurs qui peuvent agir en synergie (Kraus *et al.*, 1994). Il a été montré, pour les deux isotypes du hER, une nette augmentation de leur activité cellulaire mesurée en présence de plusieurs séquences ERE dans la région promotrice du gène rapporteur (Ponglikitmongkol *et al.*, 1990; Anolik *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 2000; Klinge, 2001; Sanchez *et al.*, 2002). Nos résultats obtenus pour hER α vont également dans ce sens : l'activité cellulaire en présence de E2 est augmentée d'un facteur de 1,5 en présence de deux séquences ERE_{cs} sans modification de l'EC₅₀. En ce qui concerne le récepteur aux œstrogènes de la truite, il est rapporté dans la littérature que son activité cellulaire est fortement augmentée lorsque 2 ou 3 séquences ERE_{cs} sont présentes dans la région promotrice d'un gène rapporteur chez la levure (Petit *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 2000; Madigou *et al.*, 2001). Nos résultats montrent que l'insertion d'un second ERE_{cs} dans le promoteur du gène rapporteur n'affecte pas l'activité cellulaire de rtER_s qui reste inchangée tout comme le facteur de stimulation hormonale. En revanche, l'EC₅₀ est modifiée suggérant que les complexes rtER_s-corégulateurs-machinerie transcriptionnelle ou que la conformation de rtER_s au sein de ces complexes sont différents en présence d'un ou deux ERE_{cs}. Nos résultats apportent une preuve de plus montrant la différence de fonctionnalité entre le récepteur aux œstrogènes humain et celui de la truite arc-en-ciel.

II. Chapitre 2 : Stabilité et flexibilité moléculaire de hER α et hER β

II.1 Introduction à l'article 2 intitulé "Estrogen receptors-ligands recognition: stability and flexibility"

Il existe deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain, hER α et hER β , qui se différencient leur répartition tissulaire différente (hER α exprimé dans les organes femelles et hER β retrouvé dans les ovaires, les organes mâles, au niveau du système nerveux central) et leur structure primaire (hER α : 595 résidus aminoacides et hER β : 530 résidus) (Mosselman *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 2005). Ils présentent une faible identité de séquence (47%). Les domaines les plus conservés sont les domaines de fixation à l'ADN (DBD, 97% d'identité de séquence) et à l'hormone (LBD, 59% d'identité). Le domaine A/B de hER β est tronqué par rapport à celui de hER α : sa séquence est plus courte de 37 résidus. En dépit de ces différences structurales, hER α et hER β présentent des fonctions semblables comme l'activation de la transcription de gènes cibles médiée par l'œstradiol (E2). A la suite de la fixation de E2 sur le récepteur aux œstrogènes, —l'isotype humain β étant plus affin que l'isotype α (Jisa *et al.*, 2001; Schultis et Metzger, 2004)— des changements conformationnels sont observés qui conduisent à la dissociation des complexes hER - protéines de choc thermique (Hsp) et à la dimérisation (Kuiper *et al.*, 1996). C'est sous leur forme dimérique, homodimère ou hétérodimère (lorsqu'ils sont exprimés dans la même cellule), que se fixent hER α et hER β sur les séquences ERE présentes dans les gènes œstrogéno-dépendants. Cependant, il a été montré que, dans un même contexte cellulaire, les homodimères de hER α présentent une activité transcriptionnelle plus importante que les hétérodimères ou les homodimères de hER β (Matthews et Gustafsson, 2003).

Si un grand nombre d'études ont porté sur la structure de ces deux récepteurs, tronqués ou non, il existe peu d'informations sur les paramètres thermodynamiques des interactions moléculaires impliquées dans la stabilisation de la conformation active de ces récepteurs. La connaissance de ces paramètres énergétiques est pourtant essentielle pour la compréhension du mécanisme cellulaire des deux récepteurs aux œstrogènes humains.

A cette fin, des études par spectroscopie de fluorescence sur les protéines recombinantes purifiées ont été menées, soit en utilisant une sonde de fluorescence intrinsèque, les résidus tryptophane, soit une sonde extrinsèque, la fluorescéine fixée covalamment à l'ADN. hER α

est pourvu de 5 résidus tryptophane (W) alors que hER β en possède 7 (Figure 4 de l'article 2). Les résidus W du hER α sont localisés de la façon suivante : 1 dans le DBD (W201), 1 dans la région charnière (W291) et 3 dans LBD (W360, W383, W393). Le positionnement des W du hER β est le suivant : 2 dans le domaine A/B (W80 et W107), 1 dans le DBD (W164) et 4 dans le LBD (W312, W335, W345 et W439). Les résidus W localisés dans le DBD et le LBD du hER α sont homologues à ceux présents dans ces domaines du hER β .

L'étude présentée ici est focalisée sur les différences de stabilité thermodynamique entre hER α et hER β et sur l'implication du réseau électrostatique dans leur flexibilité conformationnelle et leur fonctionnalité (article 2). Nous nous sommes intéressés d'autre part à rechercher l'effet de la nature des œstrogènes sur la flexibilité de hER α et hER β (résultats non publiés).

Estrogen receptors-ligands recognition: stability and flexibility

Adélaïde LE GRAND,[‡] Gaëlle MARTEIL,[§] Véronique LE TILLY,^{*,‡} and Olivier SIRE[‡]

[‡] *present address : Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux de Bretagne, Université de Bretagne-Sud, CER Yves Coppens, BP573, 56017 Vannes CEDEX, France*

[§] *present address: CNRS/Université de Rennes 1, Institut de Génétique & Développement, UMR 6061, Groupe Mitose et Méiose, Faculté de Médecine, 2 Ave. Prof. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France.*

* *Corresponding author:* Tel: 33 297 017 135. Fax. 33 297 017 071.

E-mail address: letilly@univ-ubs.fr (V. Le Tilly)

Keywords: estrogen response element, estrogen receptor, affinity, protein thermostability, flexibility, fluorescence spectroscopy, electrostatic interactions.

Abbreviations: E2, 17 β -estradiol; E_s, estrogens; ER, estrogen receptor; ERE(s), estrogen response element(s); LBD, ligand-binding domain, DBD DNA-binding domain; ERE_{cs}, consensus estrogen response element; rhER, recombinant human estrogen receptor; T_M, melting temperature; MCF-7, Human breast adenocarcinoma cell line; CHO, Chinese hamster ovary; AF-1, activation function 1; AF-2, activation function 2; RAL, raloxifene; DES, Diethylstilbestrol, 4-OHT, 4-hydroxytamoxifen; SERMs, selective ER modulators; *rtvtgERE*, ERE found in the intergenic region of the rainbow trout vitellogenin gene.

Acknowledgements : This work was supported by Le Comité du Morbihan de la Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors thank Xavier Lagrave for his help in fluorescence lifetime measurements performed at Horiba-Jobin-Yvon, Longjumeau, France.

ABSTRACT

Estrogen receptors (ERs), hormone-inducible transcription factors, play important roles on tissues growth and differentiation, either by directly or indirectly binding to specific targets called estrogen responsive elements (EREs) in the nucleus, either through non-genomic actions. In human, two estrogen receptor isoforms (hERs), designated as hER α and hER β , have been identified. These two hERs, encoded by genes located in different chromosomes, exhibit distinct tissue-specific functions and distinct subcellular distributions according to ligand binding.

Here, we address the effect of salt concentration on the hER α -EREs and hER β -EREs complexes stability, the flexibility and the conformational stability of hER α and hER β . Our results show that the conformational stability of hER β is weakly modulated by salt concentration as opposed to hER α . Additionally, the conformational flexibility of hER β is less affected by salt concentration than that of hER α . In addition, we show that liganded hERs exhibit a more constrained structure than unliganded form and their conformational flexibility is more affected by DES binding compared to E2 (estradiol), 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) or RAL (raloxifen).

Altogether our study contributes to a better knowledge of the physicochemical properties of both full-length ERs useful for understanding the cellular role of each ER.

INTRODUCTION

Estrogens, major female steroid hormones, play important roles in the reproductive system organs as breast, uterus, prostate, and also in the non-reproductive system ones as brain, bone, heart, liver (1). The physiological functions of estrogens are partly mediated through estrogen receptor (ER), a hormone-inducible transcription factor, localized in or out of the nucleus. The nuclear ER regulates, positively or negatively, the expression of genes involved in tissue growth and differentiation (2-3), either by direct contacts with specific DNA sequences located in the promoters of target genes or, by interacting with other transcriptional factors in the nucleus. The extranuclear ER exerts rapid non genomic actions which are usually associated with the activation of various protein kinase cascades (4).

The first identified human ER, designated as ER α , was cloned from MCF-7 cells where it is abundantly expressed (5-6). Ten years later, a second ER, designated as ER β , was identified in the rat prostate and ovary and was cloned in CHO cells (7-8). In humans, ER α and ER β are encoded by separate genes located on different chromosomes (8-10). These estrogen receptors exhibit distinct tissue distributions (9, 11-15), biological roles (8, 16-20) and ligand-binding affinity for various endogenous estrogen metabolites(21).

Both hERs exhibit a distinct sub-cellular distribution, while forming different protein transitory and having different functional roles. Actually, hER α is known to be mainly localized in the nucleus (22-26) whereas hER β is found in the nucleus and mitochondria (27-28). hER α and hER β regulate the expression of distinct set of genes (29-31). In mitochondria, hER β regulates the expression of proteins related to oxidative phosphorylation (30).

Human ER α and ER β , 66-kDa and 55-kDa respectively, share a modest overall sequence identity (47%) (32). ER β exhibits a truncated sequence at the N- and C-terminal extremities. The most conserved domains are the DBD and LBD, DNA- and ligand-binding domains (also called C and E domains, respectively), with 94% and 59% of identity, respectively (3, 7-8, 12, 33-36). These domains are also well-conserved among different species. The DBD is highly stabilized by two zinc-fingers. The first one specifically interacts with oligonucleotide sequences called estrogen responsive element whereas the second one is responsible for dimerization of the DBD and the orientation of the first zinc-finger (37-39). The LBD, comprising a hormone binding site, a dimerization interface and a coregulator interaction function, exhibits a helical structure. Its 11 α -helices are organized in a three-layered sandwich structure with H4, H6, H8 and H9 flanked on one side by H1 and H3, and on the other site by H7, H10 and H11. The H12 helix undergoes a differential repositioning upon the ligands binding. The other domains, A/B, D and F, share 17%, 30% and 18% of identity, respectively, and are generally considered to be flexible (34, 36).

The classical model of transactivation of ER requires not only estrogens-binding, releasing of ERs from inactive complexes, dimerization and DNA-binding processes but also nuclear localization and transcription activation processes. Actually, the binding of estrogens is responsible for the release of ER from inactive complexes (40), which consequently induces its dimerization, its transport into the nucleus and its sequence-specific binding to ERE (41-42). Once bound to its specific target sequence, ER interacts with a series of coregulators (43-48). These ER-coregulators complexes affect chromatin structure and modulate RNA polymerase II activity (47-48). These coregulators can bind to the ER amino-terminal region or to the LBD carboxyl-terminal region (43-44); thus, the transcription activation function is hormone-independent (AF-1) or hormone-dependent (AF-2) (49).

Despite the numerous structural data of both human ERs, obtained either for the full-length receptor for its domains, little information about the thermodynamic parameters of the molecular interactions responsible for stabilizing the functionally effective conformation is known. Our knowledge of these energetic features is essential for our understanding of the cellular behavior of both ERs. Thus, our study is focused on the thermodynamic stability differences between the two hERs and the relevance of the electrostatic network inside both hERs for their flexibility and their functionality. It is shown that hER α and hER β exhibit distinct flexibilities upon estrogen binding. A better knowledge of the physicochemical properties of both human ERs might allow a better understanding of the role of each ER and for the future may be useful for the development of new drugs designed to prevent breast cancer.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and Buffer Solutions. All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO) or Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, France) unless indicated otherwise. The steroid compounds used in this study, E2, DES, 4-OHT and Ral, were solubilized in ethanol except for Ral which was solubilized in DMSO. The steroid solution stock concentration was 10^{-5} M. The buffer solution was Tris-HCl 10 mM, KCl at various concentrations (80 mM, 140 mM or 200 mM), pH 7.5, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM and glycerol 10%.

Recombinant proteins. Full-length purified recombinant human ER α and ER β (rhER α and rhER β), baculovirus-expressed, were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) and stored at -80°C. The protein concentrations of ER α and ER β were 2.6×10^{-6} and 4.5×10^{-6} M, respectively. The purity of ER samples was checked by standard method using SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue R250 staining. One hour before every experiment, each protein sample was thawed and diluted to 7.5×10^{-7} M in the assay buffer. This pre-equilibration time is required for protein stabilization. Protein samples, buffers and other solutions were kept on ice for the duration of the experiments.

Fluorescein-labeled Oligonucleotides. Double stranded oligonucleotide solutions were prepared from two 21bp complementary oligonucleotidic sequences which one was coupled to fluorescein at the 5' end. These sequences were synthesized, purified and adjusted to 100 μ M by Proligo (Paris, France). The oligonucleotide sequences of the sense strand of palindromic consensus ERE (ERE_{cs}), natural rainbow trout ERE (*rtvtg*ERE) and non-specific oligonucleotide (OLIns) are GTCAGGTCACAGTGACCTGAT, AGTGGGGCAGGTAAACCTAAC and CCCACGTAAACTGACCATCC, respectively.

The duplexes were formed by diluting each oligonucleotide in the assay buffer (Tris-HCl 10 mM, KCl 80 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, glycerol 10%) in order to obtain a final oligonucleotide concentration of 1 μ M. Then both complementary oligonucleotides were mixed and heated to 85°C for 10 min and slowly cooled down to 4°C.

Steady-state fluorescence. All experiments were carried out with recombinant human ERs at $10 \pm 2^\circ\text{C}$ except for the thermal stability experiments. Steady-state fluorescence emission was measured by using a SLM8100 spectrofluorimeter. Spectra and anisotropy values were corrected by subtracting the contribution of the buffer solution to the signal. All experiments have been repeated independently at least three times.

▪ *ERs-EREs equilibrium constants.* To determine the effect of the salt concentration on the complexes formed between rhER α (or rhER β) and different ERE sequences, the fluorescence anisotropy values of fluorescein covalently bound to oligonucleotides were measured as a function of rhERs concentrations.

Fluorescein-labeled oligonucleotide fluorescence anisotropy values were monitored with an excitation wavelength of 480 nm and the bandwidth for excitation was 2 nm; the fluorescence emission intensities were collected through a 515 cut-off Oriel filter, which removes the excitation light scattering. The emission anisotropy, A , was measured according

$$\text{to: } A = \frac{F_{VV} - F_{VH} \times \left(\frac{F_{HV}}{F_{HH}} \right)}{F_{VV} + 2 \times F_{VH} \times \left(\frac{F_{HV}}{F_{HH}} \right)} \quad [1]$$

where F_{12} features the emission fluorescence intensity with subscripts 1 and 2 indicating the vertical or horizontal position of the excitation and emission polarizers, respectively. Fluorescence anisotropy measurements were carried out with an integration time of 5 s on each emission intensity component.

For rhERs-oligonucleotide binding titration experiments, the oligonucleotide concentration was kept constant at 10^{-9} M and the protein concentration was varied between 2×10^{-10} and 3×10^{-8} M. Prior collecting anisotropy values, the sample (oligonucleotide plus protein) was incubated for 10 min to allow protein-oligonucleotide complexation. These binding titration experiments were performed at 80, 140 or 200 mM KCl.

The dissociation constant, K_D of the rhER-ERE equilibrium is recovered by fitting the binding titration curve by using the equations below assuming that, within the protein concentration range used, only one equilibrium is observed:

$$A = \frac{K_D}{[rhER] + K_D} \times A_{DNA^*} + \frac{[rhER]}{[rhER] + K_D} \times A_{DNA^*-rhER} \quad [2]$$

with A_{DNA^*} and A_{DNA^*-rhER} , the anisotropy values of fluorescein-labeled oligonucleotide and fluorescein-labeled oligonucleotide covalently bound to rhER, respectively, and $[rhER]$, the concentration of free rhER.

As under few experimental conditions, the concentration of oligonucleotide is slightly lower than the K_D value, the equation used for fitting the data and extracting the K_D value is:

$$A = \left[1 - \frac{\left(([DNA^*] + [rhER] + K_D) - \sqrt{([DNA^*] + [rhER] + K_D)^2 - 4 \times [rhER] \times [DNA^*]} \right)}{2 \times [DNA^*]} \right] \times A_{DNA^*} + \left[\frac{\left(([DNA^*] + [rhER] + K_D) - \sqrt{([DNA^*] + [rhER] + K_D)^2 - 4 \times [rhER] \times [DNA^*]} \right)}{2 \times [DNA^*]} \right] \times A_{DNA^*-rhER} \quad [3]$$

The values of the dissociation equilibrium constant (K_D) were obtained by nonlinear least-squares curve fitting using the commercial Peakfit software.

▪ *rhERs flexibility.* To determine the effect of the salt concentration and the ligand binding on the rhERs flexibility, the dynamic accessibility of tryptophanyl residues in each rhER form was monitored by fluorescence quenching experiments.

Tryptophan fluorescence quenching experiments were achieved by using acrylamide which is known to be an efficient quencher of tryptophanyl fluorescence (50-51). Fluorescence spectra were obtained with bandwidths fitted for an excitation and emission resolution of 4 and 2 nm, respectively. The excitation wavelength was 290 nm to ensure that the measured fluorescence was due to the sole tryptophanyl residues. Fluorescence emission intensity was collected with an integration time of 1 s, between 300 and 430 nm. Each displayed spectrum is the average of 4 acquisitions.

These experiments were carried out at 5×10^{-8} M rhERs and various acrylamide concentrations from 0 to 0.17 M. Stock acrylamide solutions (2 M) were obtained by dissolving acrylamide (Sigma) in the assay buffer. For experiments with ligands were performed at 140 mM KCl in the presence of E2, DES, 4-OHT or RAL at a final concentration of 10^{-7} M to achieve 99% of rhERs complexation (52).

The quenching of fluorescence of fluorophore residues in proteins can occur according to two ways: (i) static quenching arising from formation of a complex between fluorophore and quencher before excitation, and/or (ii) dynamic quenching resulting from encounters of fluorophore and quencher molecules during the excited state lifetime. When both occur, the quenching process can be analyzed according to the modified Stern-Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} \times [Q]) \times (1 + K_a \times [Q]) \quad [4]$$

where F_0 and F feature the fluorescence intensity in absence and in presence of the quencher Q, respectively and, K_{SV} and K_a are the collisional and static quenching constants, respectively. If a single process is operating or dominating, the plot F_0/F vs $[Q]$ is linear; if both processes occur, the plot F_0/F vs $[Q]$ will exhibit an upward curvature.

For proteins having several fluorophore residues, the quenching data can be described by the Lehrer's equation:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a \times K_{SV}} \times \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad [5]$$

where $\Delta F = F_0 - F$ is the fluorescence intensity decrease observed at the quencher concentration $[Q]$; f_a is the fractional maximum of the accessible fluorophores and K the quenching constant. For dynamic quenching, the constant K_{SV} is equal to the product $k_q \times \langle \tau \rangle$, where k_q is the bimolecular collisional rate constant and $\langle \tau \rangle$ the average fluorescence lifetime in the absence of quencher. The fraction of the accessible fluorophores was determined from the y-intercept of the plot $F_0/\Delta F$ vs $1/[Q]$ and the apparent quenching constant from the ratio of the y-intercept to the slope.

▪ *rhERs thermal stability.* To measure the effect of the salt concentration on the stability of the two human estrogen receptor isoforms, the fluorescence intensity of tryptophanyl residues in rhERs was monitored as a function of temperature. The fluorescence intensities were measured by exciting the protein sample at 290 nm and collecting the emission at 338 nm. These experiments were performed by raising the temperature from 5°C to 55°C with a 3°C step and the signal was recorded 10 minutes after having increased the temperature. To obtain the apparent T_M and the enthalpy change (ΔrH) of ERs unfolding, the data were fitted by using a two-state ($N \xrightleftharpoons{K} D$) or a three-state ($N \xrightleftharpoons{K_1} I \xrightleftharpoons{K_2} D$) model according to the following mathematical equations:

$$I_{obs} = \frac{1}{1 + K} \times [I_N + K \times I_D], \text{ with } K = e^{\frac{\Delta rH}{RT} \times \left(\frac{T}{T_M} - 1 \right)} \quad [6]$$

$$\text{or, } I_{obs} = \frac{1}{1 + K_1 + K_1 \times K_2} \times [I_N + K_1 \times I_I + K_1 \times K_2 \times I_D] \quad [7]$$

$$\text{with } K_1 = e^{\frac{\Delta rH_1}{RT} \times \left(\frac{T}{T_{M1}} - 1 \right)} \text{ and } K_2 = e^{\frac{\Delta rH_2}{RT} \times \left(\frac{T}{T_{M2}} - 1 \right)}$$

where I_N , I_I and I_D are the fluorescence intensities of the native, intermediary and denatured ERs forms, respectively. K and ΔrH are the protein unfolding equilibrium constant and the apparent van't Hoff enthalpy of unfolding. T_M is the temperature at the midpoint of the unfolding transition. I_N , I_I , I_D , ΔrH and T_M values were recovered from nonlinear least-squares curve fitting using the commercial Peakfit software. The displayed values of T_M and ΔrH are apparent values because of the non-reversibility of the observed unfolding process.

Time-resolved fluorescence measurements. Tryptophan fluorescence lifetime measurements were carried out with Fluoromax-3 fluorescence spectrophotometer from Horiba-Jobin-Yvon (Longjumeau, France). An electroluminescent diode with a pulse width of 800 ps was used for excitation and a Hamamatsu photomultiplier R928 was used to detect the fluorescence. Samples were excited at 280 nm and emission intensities were recorded at 338 nm. Slit widths of the excitation and emission monochromators were 15 nm and 10 nm, respectively. The decay curves were analyzed by a three-exponential iterative fitting program Daf6 (Horiba Scientific). The mean lifetime was calculated from:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad [8]$$

where α_i is the molar fraction of component i and τ_i is the lifetime of each discrete exponential components.

RESULTS

To study the relationship between flexibility and stability of ER, the effect of the salt concentration and the ligand nature on these two properties of rhER α and rhER β has been investigated. Previously, we have shown that the interaction between rhER α and its ERE targets depends on the conformational flexibility of rhER α (53). This work aims to understand the factors that contribute to the conformational stability of the two hER isoforms and then to their biological function.

The interaction between rhER β and EREs is ruled by electrostatic interactions.

The ability of rhER β to interact with different ERE sequences has been monitored by using the fluorescence anisotropy methodology. This technique allows evaluating, in solution, the impact of physicochemical parameters on the interaction between molecules (54-57). For this study, ER β binding to two oligonucleotide target sequences, consensus and imperfect EREs, has been carried out with a 21bp double stranded oligonucleotide labeled at the 5' end with fluorescein. The ERE consensus, ERE_{cs}, bears the palindromic AGGTCA half-site separated by 3bp from the other site. The imperfect ERE, *rtvtg*ERE, has been identified in the intergenic region of the rainbow trout vitellogenin gene.

In this study, the KCl concentration effect on the interaction between rhER β and both ERE sequences has been investigated. A previous study carried out with rhER α has already reported the KCl effect on the rhER α -ERE complexes formation (53). The fluorescein-labeled EREs were titrated with rhER β until the anisotropy value reached a plateau, which reflects the saturation of the binding sites. The resulting ERE-ER binding curve was fitted to equation [3] to recover the K_D values. The Figure 1 displays the effect of KCl concentration on the interaction between rhER β and ERE_{cs}. The binding curve is displaced toward the high

protein concentrations as the KCl concentration increases. Thus, the affinity of the complex decreases at higher salt concentration. Since the electrostatic interactions are weakened with salt, this result shows that the interaction between rhER β and ERE_{cs} is essentially ruled by electrostatic forces. A similar result is observed for the interaction of rhER β with an imperfect ERE (Figure 1). Whatever the salt concentration, rhER β -*rtvtg*ERE is less affine than rhER β -ERE_{cs}. Furthermore, the salt effect is more pronounced for rhER β -*rtvtg*ERE than for rhER β -ERE_{cs} complex. This result indicates that the nature and/or the number of electrostatic interactions stabilizing both complexes are different. Table 1 displays the different K_D values obtained. Whatever the ERE sequence and whatever the salt concentration, our results show that rhER α exhibits a higher affinity for ERE sequences than rhER β . The salt modulation is slightly more pronounced with rhER β compared to rhER α .

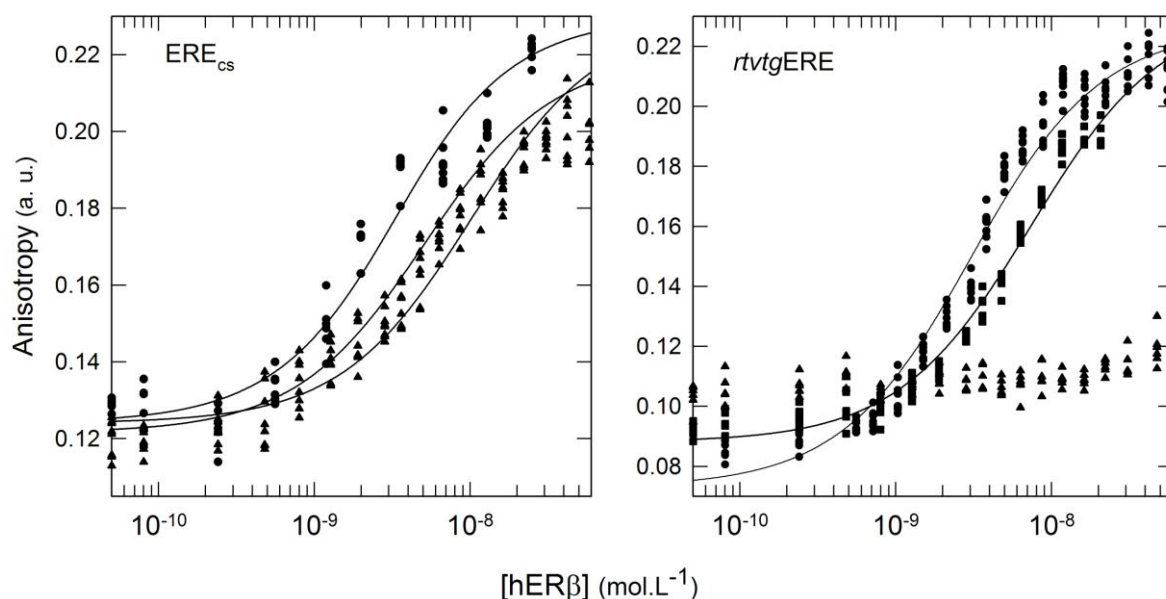


FIGURE 1: Fluorescence anisotropy profiles of fluorescein-labeled ERE upon rhER β binding. Titrations of 1 nM labeled ERE_{cs} and *rtvtg*ERE are performed at various KCl concentrations: 80 mM (●), 140 mM (■) and 200 mM (▲) of KCl. Experimental conditions are 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10°C. The lines through the data result from data fitting using a single equilibrium model (equation [3]).

Table 1: K_D values for *rhERs-EREs* interactions.

		K_D ($\cdot 10^{-9}$ mol.L $^{-1}$)		
[KCl]		80 mM	140 mM	200 mM
rhER α	ERE $_{cs}$	2.0 ± 0.5^a	3.0 ± 0.4^b	4.8 ± 0.7^a
	rtvtgERE	2.5 ± 0.8^a	6.2 ± 0.3^a	$>40^a$
rhER β	ERE $_{cs}$	3.3 ± 0.7	4.6 ± 1.2	9.3 ± 0.7
	rtvtgERE	3.8 ± 0.5	7.1 ± 1.3	>50

^a The K_D values of hER α in presence of 80 mM and 200 mM KCl were previously reported (53). ^b The K_D value of hER α in presence of 140 mM KCl was previously reported (58)

Electrostatic network inside rhER α and rhER β

It is generally accepted that an increased thermal stability is due to an increased electrostatic interactions (ion pairs, H bonds, ...); Thus, temperature-induced unfolding experiments of rhERs have been undertaken for reporting the importance of the electrostatic network within these two proteins. This was achieved by collecting the fluorescence emission of tryptophanyl residues after heating the protein samples from 5°C to 55°C. The total intensity decreases following the temperature increase (Figure 2A). This temperature-induced fluorescence decrease has been analyzed according to a two-state and a three-state model (Figure 2B). The best fit is obtained with a three-state model. As shown in Figures 3, this biphasic behaviour of temperature-induced unfolding is observed for rhER α and rhER β at different KCl concentrations. The thermodynamic parameters of ERs unfolding have been recovered by fitting the curves according to a three-state model (Table 2). As the thermal unfolding of ERs is not reversible under our investigated conditions, the thermodynamic parameters determined are only apparent values. The transition midpoints of rhER α for

thermal denaturation, T_M , decrease as KCl concentration increases, indicating a reduced thermal stability of rhER α in the presence of higher salt concentration. This result is in agreement with the fact that more the salt concentration increases more the electrostatic interactions decrease and subsequently the less stability of the protein is. For rhER β , the thermal denaturation is weakly affected by KCl concentration within the range used here. These data indicate that the thermal unfolding process of rhER α is highly sensitive to salt concentrations compared to rhER β . Furthermore, whatever the salt concentration, the rhER α T_M values are greater than that of rhER β , which indicates that the overall stability of rhER α is higher than that of rhER β .

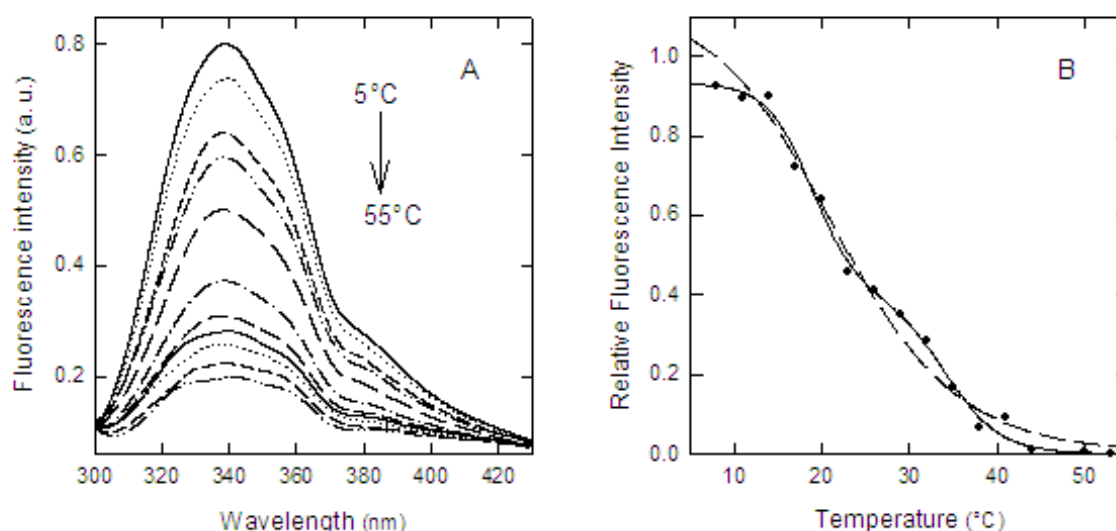


FIGURE. 2. **Thermal unfolding of rhER.** Panel A: Fluorescence emission spectra of recombinant human ER β as a function of temperature. Excitation wavelength was 290 nm. Panel B: Relative fluorescence intensity of rhER β in presence of 200 mM KCl ($\lambda_{em} = 338$ nm). The data were fit according to two models (Equation [7]): a two-state-model (— —) and a three-state model (—).

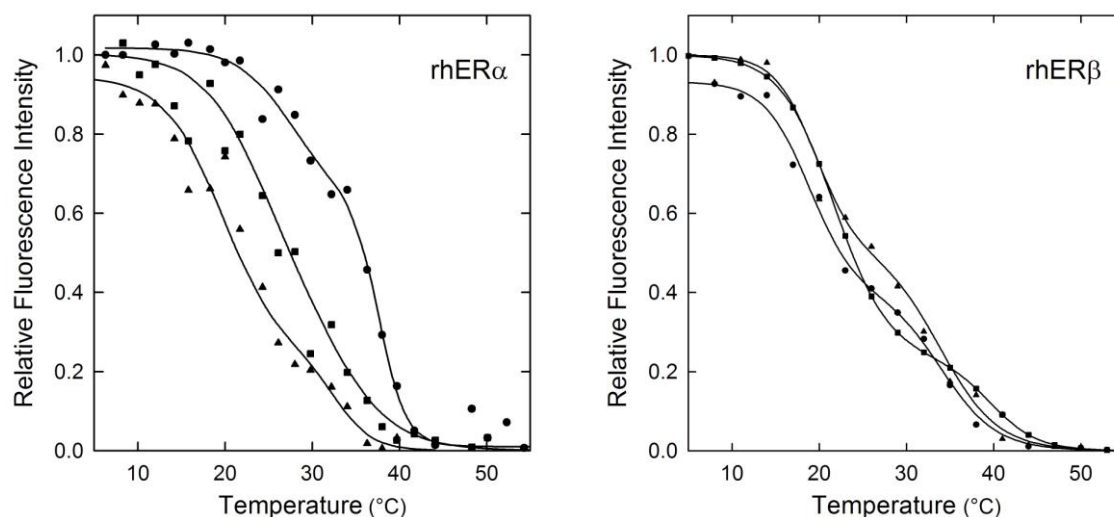


FIGURE. 3. **Thermal unfolding curve of rhERs as a function of salt concentration.** The Trp relative fluorescence intensity was monitored, at 338 nm, as a function of temperature (pH 7.5, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm). KCl concentrations are: 80 mM (●), 140 mM (■) and 200 mM (▲). The data were fitted according to a three-state model.

Table 2: *Effect of KCl concentration on the thermal unfolding of rhERs at pH 7.5 using van't Hoff analysis.*

rhER α				rhER β		
[KCl]	$T_M(^{\circ}\text{C})$	ΔrH (kJ/mol/K)	ΔrS (kJ/mol)	$T_M(^{\circ}\text{C})$	ΔrH (kJ/mol/K)	ΔrS (kJ/mol)
80 mM	27.9 ± 2.0	233 ± 127	0.77	18.9 ± 0.8	271 ± 87	0.93
	37.7 ± 0.8	520 ± 179	1.67	34.2 ± 1.5	255 ± 71	0.83
140 mM	24.2 ± 0.5	197 ± 97	0.66	21.8 ± 0.2	231 ± 12	0.78
	33.5 ± 0.8	214 ± 108	0.70	39.9 ± 0.7	310 ± 61	0.99
200 mM	19.9 ± 0.7	208 ± 38	0.71	19.6 ± 1.1	299 ± 81	1.02
	33.0 ± 1.2	365 ± 110	1.19	34.1 ± 0.7	244 ± 50	0.79

The unfolding being not reversible, the determined T_M and ΔrH are apparent values. The displayed data come from the data fitting by using a three-state model. ΔrS has been calculated by using $\Delta rS = \frac{\Delta rH}{T_M}$. Experimental conditions: $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 338$ nm.

Electrostatic interactions play a role in the rhERs flexibility.

Based upon sequence analysis (Figure 4), hER α is constituted by five tryptophanyl residues among which one residue is localized in the DBD, another one is found in the hinge region and the others are in the LBD. hER β contains seven tryptophanyl residues, among which four are in the LBD (three at equivalent positions of hER α), another one in the DBD (at equivalent position of hER α) and two are found in the N-terminal extremity of the protein.

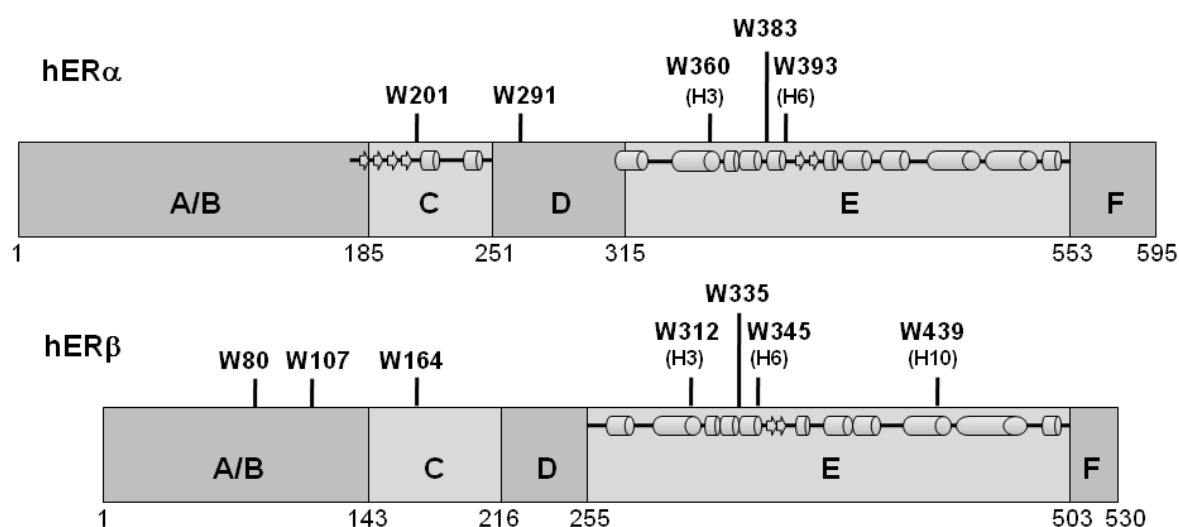
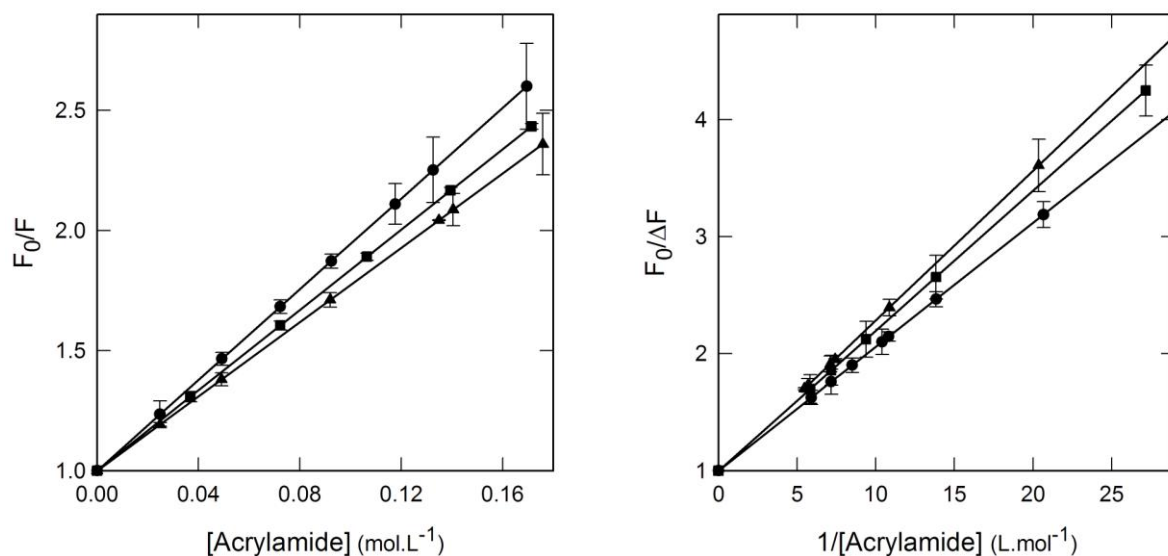


FIGURE. 4. Positions of Tryptophan residues within the hER α and hER β isoforms. The position of the tryptophanyl residues is represented along the primary structure simplified of the two estrogen receptor isoforms. The tryptophanyl residues found in a α -helix is shown by the α -helix number between brackets. The secondary structure of the DBD and LBD of the hERs is shown schematically : helices are represented by cylinders and β -strands as arrows.

The ER flexibility was assessed by the dynamical accessibility of protein tryptophan fluorescence to the acrylamide. This neutral quencher is able to diffuse inside the hydrophobic core of the proteins while colliding the tryptophanyl residues. The fluorescence spectra of tryptophanyl residues were collected at increasing concentrations of acrylamide (data not shown). The Stern–Volmer plots, $F_0/F = f([acrylamide])$, are displayed in Figure 5. Within the used acrylamide concentrations range, the Stern-Volmer plots are linear, indicating that the observed quenching occurs mainly *via* a dynamic process. Whatever ER and KCl concentration, each tryptophan residue is quenched by acrylamide. Table 3 gives the K_{SV} values calculated from the slope of the curves (see equation [5]). From the time-resolved fluorescence experiments, the decay curves have been analyzed by using a three-exponential model. The average lifetime, calculated from equation [8], has been used to determine the collisional rate constant between acrylamide and tryptophan residues. Whatever the ER isoform, the collisional rate constant decreases as salt concentration increases, indicating that the dynamic accessibility of tryptophan residues is decreased as the salt concentration increases. Furthermore, the dynamic accessibility of tryptophan inside rhER α is slightly lower than that of rhER β indicating that this isoform exhibits a more constrained conformation.

A



B

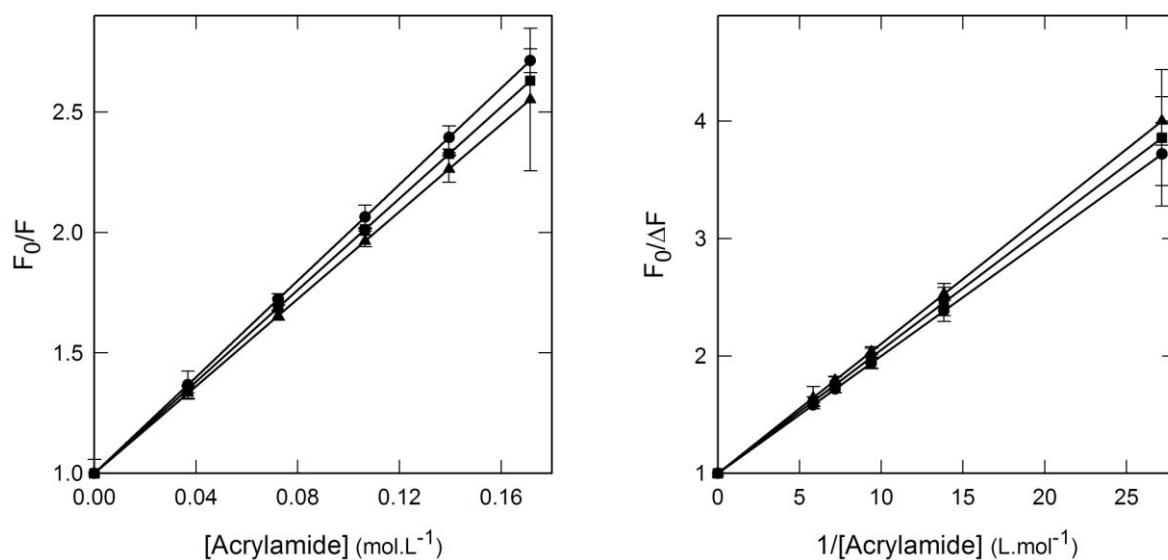


FIGURE 5. **Fluorescence quenching of rhERs by acrylamide as a function of KCl concentration.** A. rhER α and B. rhER β . Symbols used are: (●) 80 mM, (■) 140 mM and (▲) 200 mM of KCl. Left Panels : Stern-Volmer plots, $F_0/F = f([Acrylamide])$; Right Panels : Lehrer plots, $F_0/\Delta F = f(1/[Acrylamide])$. Experimental conditions are: pH 7.5 and 10°C.

Table 3: *Fluorescence quenching parameters of rhERs by acrylamide as a function of KCl concentration.*

[KCl]	rhER α		rhER β	
	K_{SV} (mol ⁻¹ .L)	k_q (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)	K_{SV} (mol ⁻¹ .L)	k_q (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)
80 mM	9.4 \pm 0.3	1.72x10 ⁹	10.0 \pm 0.3	1.82x10 ⁹
140 mM	8.5 \pm 0.2	1.56x10 ⁹	9.5 \pm 0.5	1.73x10 ⁹
200 mM	7.8 \pm 0.2	1.43x10 ⁹	9.0 \pm 0.3	1.64x10 ⁹

Symbols used: K_{SV} , the Stern-Volmer constant value was determined from the intensity fluorescence quenching experiments with acrylamide; $\langle \tau \rangle$, the average lifetime value calculated from fluorescence decay measurements was 5.45 ns; k_q , the bimolecular collisional rate constant was calculated from $k_q = \frac{K_{SV}}{\langle \tau \rangle}$. Experiments are performed at 10 \pm 2°C in 10 mM Tris HCl, 140 mM KCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and glycerol 10%.

Effect of ligand on the rhERs flexibility.

A previous study has reported that the LBD structural plasticity allows the binding of various steroid ligands (59-60). Among them, three categories of steroid ligands, called agonists, antagonists and SERMs, would induce, upon their binding, distinct conformational changes as the repositioning of the helix 12 (61-65). The orientation of this helix modulates the coactivator binding to the LBD, while bringing about a differential recruitment of corepressors to the AF-2 region and of coactivators to the AF-1 region (66-67).

Our study, carried out by fluorescence quenching and time-resolved fluorescence experiments, has allowed investigating the effect of agonists (E2 and DES) and SERMs (4-OHT and RAL) on the entire protein flexibility through the measurements of the dynamical accessibility of tryptophan. This work has been performed in presence of 140 mM KCl. As

shown in figure 6, whatever the ER complexation state, bound or not with ligands, all the tryptohan residues are accessible and, the observed quenching is mostly dynamic in nature. Table 4 displays the K_{SV} and k_q values obtained for both rhERs, complexed or not to ligands. In presence of ligands, the k_q values are lower than that observed in absence of ligand. This result means that the dynamic accessibility of tryptophan within the ERs is reduced upon ligand binding. Now, whatever the complexation state and the bound ligand, rhER β is less constrained than rhER α . Furthermore, no specific effect on the rhERs flexibility related to the ligand category has been observed.

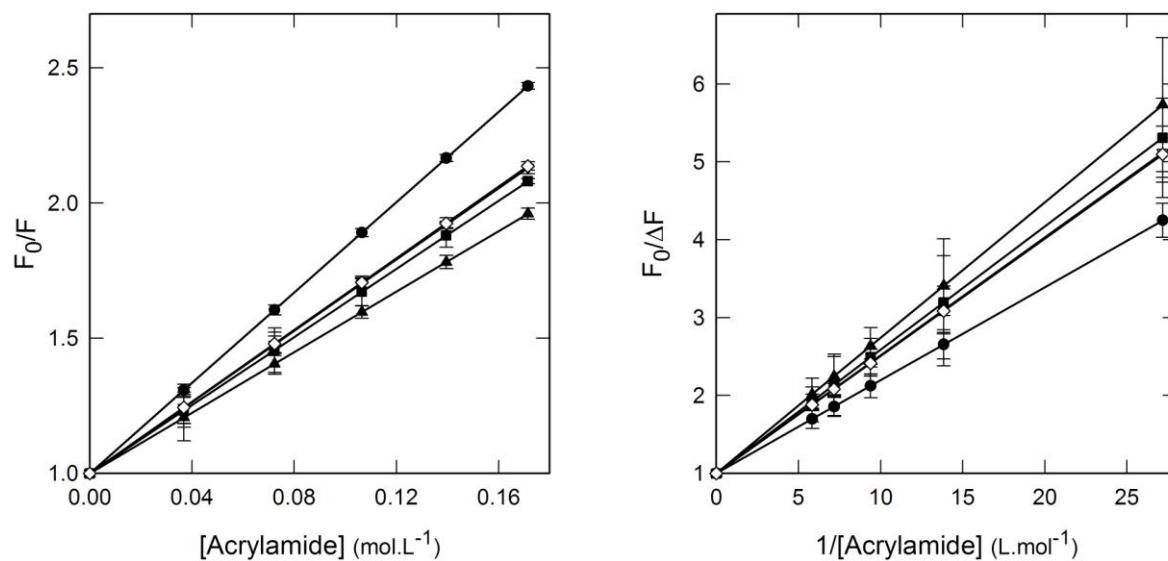
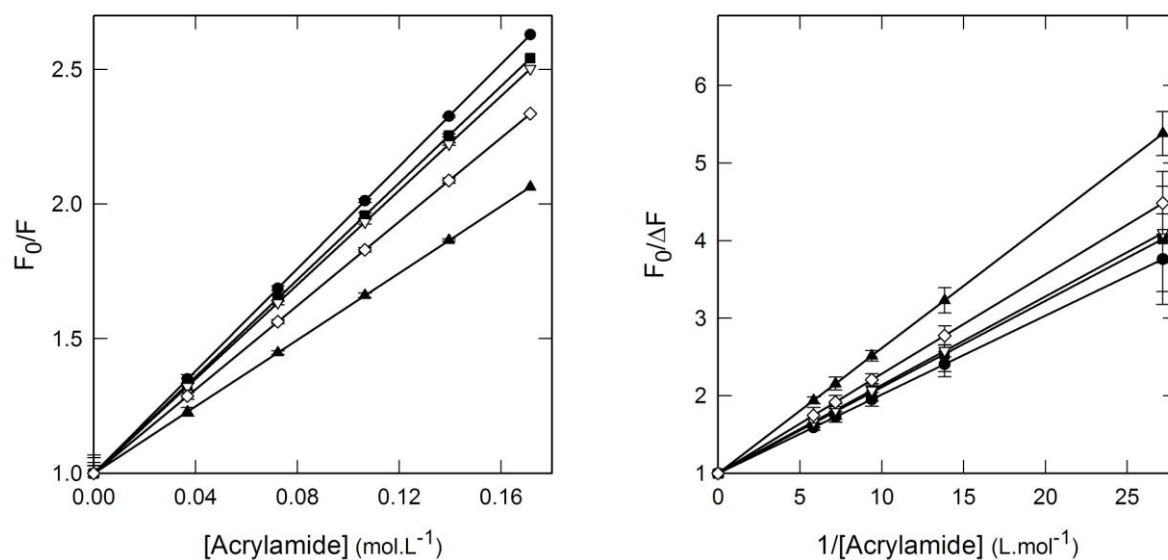
A**B**

FIGURE 6. **Fluorescence quenching of rhERs by acrylamide in presence or not of ligand.**

A. rhER α and B. rhER β . Symbols used are: (●) none ligand, (▲) E2, (■) DES, (▽) 4-OHT, (◇) Ral. Left Panel : Stern-Volmer plots, $F_0/F = f([Acrylamide])$; Right Panel : Lehrer plots, $F_0/\Delta F = f\left(\frac{1}{[Acrylamide]}\right)$. Experimental conditions: 140 mM KCl, pH 7.5 and 10°C.

Table 4: *Fluorescence quenching parameters of liganded rhERs by acrylamide.*

Ligand	rhER α			rhER β		
	K_{SV} (mol ⁻¹ .L)	$\langle \tau \rangle$ (ns) (χ^2)	k_q (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)	K_{SV} (mol ⁻¹ .L)	$\langle \tau \rangle$ (ns) (χ^2)	k_q (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)
none	8.4 \pm 0.5	5.45 (1.06)	1.56x10 ⁹	9.5 \pm 0.5	5.48 (1.04)	1.79x10 ⁹
E2	6.3 \pm 0.4	5.74 (0.98)	1.10x10 ⁹	9.0 \pm 0.8	5.52 (1.18)	1.63x10 ⁹
DES	5.6 \pm 0.4	5.93 (1.04)	0.98x10 ⁹	6.2 \pm 0.3	5.95 (1.12)	1.11x10 ⁹
4-OHT	6.6 \pm 0.2	5.99 (1.17)	1.10x10 ⁹	8.4 \pm 0.3	5.26 (1.19)	1.60x10 ⁹
Ral	6.2 \pm 0.6	5.60 (1.13)	1.18x10 ⁹	7.8 \pm 0.3	5.58 (1.18)	1.40x10 ⁹

Symbols used: K_{SV} , the Stern-Volmer constant value was determined from the intensity fluorescence quenching experiments with acrylamide; $\langle \tau \rangle$, the average lifetime value calculated from fluorescence decay measurements and χ^2 , the reduced chi-square; k_q , the bimolecular collisional rate constant was calculated from $k_q = \frac{K_{SV}}{\langle \tau \rangle}$.

DISCUSSION

Regulation of gene expression by estrogen receptors involve several events as estrogens binding, ERs releasing from inactive complexes, binding of dimeric ERs to EREs located in the promoters of ER-regulated genes and recruitment of coregulators. Thus, ERs can regulate either directly the expression of genes by binding to EREs or indirectly, by passing direct interaction with EREs, but binding to DNA sequences through interaction with other transcriptional factors in the nucleus. Furthermore, ERs are also involved in the nongenomic actions of estrogens. These different Es-mediated biological functions, occurring in different cellular compartments, require that ERs exist under different forms within distinct cell compartments. Today, two isoforms of the human estrogen receptor have been identified, hER α and hER β . These two ERs, when expressed in a same organ, exhibit distinct abundances depending on the period of development. Additionally, these two ERs can exhibit not only a tissue-specific expression but also an Es-mediated specific biological function within the tissue. Expressed together, they preferentially form heterodimers (68) which exhibit a lower transcriptional activity than the hER α homodimers as an aftermath of their reduced efficiency to recruit coactivators (69). In MCF-7 cells, it is fairly well stated that hER α is accumulated in the nucleus even in absence of Es and some nuclear punctuate patterns containing the receptor appear following hormonal stimulation (70). Thus, our understanding of the factors which regulate the intracellular trafficking, assembly or not within large complexes of hERs, and so on, mainly relies on our knowledge about the physicochemical characteristics of hERs. Accordingly, this study is focused on the characterization of the stability and flexibility of these two full-length receptors.

As previously reported, hER α and hER β strongly interact with EREs consensus or degenerated sequences, at low salt concentration, and the specificity of these complexes is enhanced by increasing salt concentration (53-54, 56, 58). The *rtvtgERE* degenerated

sequence used is that identified in the promoter region of vitellogenin genes of *Oncorhynchus mykiss* (58). The complex formation between hERs and ERE_{cs} is little affected by salt concentration. Actually, between 80 and 200 mM KCl, the K_D value of this hERs-ERE_{cs} complex remains in the nanomolar range. The salt effect on the complex formation between hERs and *rtvtg*ERE is more pronounced: the K_D value of this complex is above 40 nM at 200 mM KCl. This salt effect agrees with the stabilization of hERs-EREs complexes by direct and water-mediated hydrogen bonds (37, 71). Indeed, it has been shown that the interaction between hER residues and ERE phosphates implicate more water molecules with an imperfect ERE than with the ERE_{cs} (71). Additionally, whatever the KCl concentration, hER α exhibits a slightly higher affinity for the tested ERE as compared to hER β . This slight difference in affinity has been attributed to an altered DNA conformation within hERs-ERE complexes: ERE undergoes a bending upon hER α complexation, whereas no change was observed with hER β (72). Thanks to crystallography studies, the amino acid residues involved in the interaction between the hER α -DBD and ERE sequence are known and, by comparing the DBD sequence of both hERs, we noticed that no residue differs. Hence, the ERE bending, only observed with hER α , might be due to a distinct flexibility between both hERs. From the present fluorescence quenching experiments, it appears that all tryptophanyl residues exhibit a homogenous dynamical accessibility whatever their localization in both hERs. As previously observed with hER α , increasing the salt concentration leads to restricted fluctuations inside hER β . This salt effect being slightly more pronounced with hER α than with hER β , the electrostatic networks within the two isoforms must differ. In this study, the conformational stability of both hERs was probed by thermal-induced denaturation monitored from the tryptophan residues fluorescence. Here we show that the hER α and hER β temperature driven unfolding process follows a three-state model. A similar result has been already reported (73). We demonstrate that, in opposite to the hER β isoform, the conformational stability of hER α

is modulated by salt concentration. As a whole, the conformational stability of hER β is weaker than that of hER α , this difference being less pronounced at high salt concentration. The point is that, at physiological temperature, both uncomplexed hERs exhibit a rather unstable conformation. This feature must be relevant in the cell physiological and physicochemical context. Indeed, it can be inferred that any cellular variation of ions fluxes within a given subcellular compartment must alter both conformational stability and flexibility of hERs.

Following steroid ligands binding, estrogen receptors undergo conformational changes essential for their transcriptional activity. However, it has been reported that the ER binding to ERE is not dependent on ligand binding (54, 74). Then, ligand-dependent transactivation of ERs arises from ligand-induced conformational changes which are decisive for the recruitment of coregulators. It has been assumed for long that the full-length ER and the LBD adopt similar conformational changes upon ligand binding. To date, it is perfectly stated that full-length ER and LBD adopt different conformations (75).

It has been previously reported that both hERs undergo distinct conformational changes and conformational stabilities as a result of E2 and 4-OHT binding. Both ligands affect the conformation of hER α but E2 only increases its thermal stability, whereas both ligands binding enhance the thermal stability of hER β but E2 only affects its conformation (76-77).

Our results, obtained from combined fluorescence quenching fluorescence and time-resolved data, show that the flexibility of both hERs is decreased, whatever bound ligand. It is observed that flexibility changes decrease as: RAL>E2~4-OHT>DES for hER α and as E2~4-OHT >RAL>DES for hER β . These results show that E2 and 4-OHT exert a similar effect on the flexibility of both hERs and that DES is the ligand which induces the greater flexibility changes. Agonist as antagonist ligands binding to full-length ERs induces numerous

conformational changes with distinct flexibilities. Protein flexibility and ligand categories (agonist, antagonist or SEM) cannot be linked.

Consistent with our study and other published results, the structural and energetic features of full-length estrogen receptors may constitute key factors of the ERs fate in the cells. Flexibility, conformational states and conformational stability of ERs must mediate the protein-protein and protein-DNA interactions as well as the subcellular localization. Here, we demonstrate the relevance of *in vitro* measurements for investigating the cellular behavior of transcriptional factors without disregarding the potential of signaling mechanisms which may allow vanishing of the system enthalpy.

REFERENCES

1. Gustafsson, J. A. (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action, *The Journal of endocrinology* 163, 379-383.
2. Gruber, C. J., Gruber, D. M., Gruber, I. M., Wieser, F., and Huber, J. C. (2004) Anatomy of the estrogen response element, *Trends Endocrinol Metab* 15, 73-78.
3. Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (2002) Biological role of estrogen and estrogen receptors, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 37, 1-28.
4. Losel, R., and Wehling, M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
5. Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and Chambon, P. (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA, *Journal of Steroid Biochemistry* 24, 77-83.
6. Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA, *Science* 231, 1150-1154.
7. Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J. (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5925-5930.
8. Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *FEBS letters* 392, 49-53.
9. Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J. A. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.

10. Menasce, L. P., White, G. R., Harrison, C. J., and Boyle, J. M. (1993) Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique, *Genomics* 17, 263-265.
11. Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K. S., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2001) ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins, *Mol Endocrinol* 15, 2064-2077.
12. Katzenellenbogen, B. S., and Korach, K. S. (1997) A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta, *Endocrinology* 138, 861-862.
13. Saunders, P. T., Maguire, S. M., Gaughan, J., and Millar, M. R. (1997) Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry, *J Endocrinol* 154, R13-16.
14. Shughrue, P. J., Lane, M. V., and Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system, *J Comp Neurol* 388, 507-525.
15. Spong, C. Y., McCune, S. K., Sternberg, E. M., and Gustafsson, J. A. (2000) Maternal estrogen receptor-beta expression during mouse gestation, *Am J Reprod Immunol* 44, 249-252.
16. Koehler, K. F., Helguero, L. A., Haldosen, L. A., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta, *Endocrine Reviews* 26, 465-478.
17. Cowley, S. M., and Parker, M. G. (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta, *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 165-175.
18. Hall, J. M., and McDonnell, D. P. (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key

- regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens, *Endocrinology* 140, 5566-5578.
19. Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., and Gustafsson, J. A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology* 139, 4252-4263.
 20. Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G., and Gustafsson, J. A. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha, *Molecular Endocrinology* 11, 1486-1496.
 21. Zhu, B. T., Han, G. Z., Shim, J. Y., Wen, Y., and Jiang, X. R. (2008) Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor α and β subtypes: insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding, *Endocrinology* 147, 4132-4150.
 22. Gasc, J. M., and Baulieu, E. E. (1986) Steroid hormone receptors: intracellular distribution, *Biol Cell* 56, 1-6.
 23. Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., and Hager, G. L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor, *Molecular biology of the cell* 10, 471-486.
 24. Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., and Yamamoto, K. R. (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors, *Cell Regulation* 1, 291-299.
 25. Stenoien, D. L., Mancini, M. G., Patel, K., Allegretto, E. A., Smith, C. L., and Mancini, M. A. (2000) Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1, *Mol Endocrinol* 14, 518-534.

26. Stenoien, D. L., Patel, K., Mancini, M. G., Dutertre, M., Smith, C. L., O'Malley, B. W., and Mancini, M. A. (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent, *Nature cell biology* 3, 15-23.
27. Chen, J. Q., Russo, P. A., Cooke, C., Russo, I. H., and Russo, J. (2007) ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins, *Biochim Biophys Acta* 1773, 1732-1746.
28. Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., and Yager, J. D. (2004) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1011-1022.
29. Katzenellenbogen, B. S., and Katzenellenbogen, J. A. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer, *Breast Cancer Research* 2, 335-344.
30. O'Lone, R., Knorr, K., Jaffe, I. Z., Schaffer, M. E., Martini, P. G., Karas, R. H., Bienkowska, J., Mendelsohn, M. E., and Hansen, U. (2007) Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species, *Mol Endocrinol* 21, 1281-1296.
31. Yang, S. H., Sarkar, S. N., Liu, R., Perez, E. J., Wang, X., Wen, Y., Yan, L. J., and Simpkins, J. W. (2009) Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor, *J Biol Chem* 284, 9540-9548.
32. Murphy, L. C., Weitsman, G. E., Skliris, G. P., Teh, E. M., Li, L., Peng, B., Davie, J. R., Ung, K., Niu, Y. L., Troup, S., Tomes, L., and Watson, P. H. (2006) Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast

- cancer in vivo, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 102, 139-146.
33. Hillisch, A., Peters, O., Kosemund, D., Muller, G., Walter, A., Schneider, B., Reddersen, G., Elger, W., and Fritzemeier, K. H. (2004) Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design, *Mol Endocrinol* 18, 1599-1609.
 34. Lazennec, G. (2006) Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis, *Cancer Lett* 231, 151-157.
 35. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001) Mechanisms of estrogen action, *Physiological reviews* 81, 1535-1565.
 36. Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R. C., and Ali, S. (1997) Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha, *J Biol Chem* 272, 25832-25838.
 37. Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements, *Cell* 75, 567-578.
 38. Schwabe, J. W., Neuhaus, D., and Rhodes, D. (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor, *Nature* 348, 458-461.
 39. Luisi, B. F., Schwabe, J. W., and Freedman, L. P. (1994) The steroid/nuclear receptors: from three-dimensional structure to complex function, *Vitamins and hormones* 49, 1-47.
 40. Ylikomi, T., Wurtz, J. M., Syvala, H., Passinen, S., Pekki, A., Haverinen, M., Blauer, M., Tuohimaa, P., and Gronemeyer, H. (1998) Reappraisal of the role of heat shock

- proteins as regulators of steroid receptor activity, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 437-466.
41. Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R. M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase, *Cell* 98, 675-686.
 42. Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription, *Cell* 103, 843-852.
 43. Klinge, C. M. (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors, *Steroids* 65, 227-251.
 44. Hall, J. M., and McDonnell, D. P. (2005) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting, *Mol Interv* 5, 343-357.
 45. Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S., and Tung, L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors, *Molecular Endocrinology* 10, 1167-1177.
 46. McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology, *Endocr Rev* 20, 321-344.
 47. Robyr, D., Wolffe, A. P., and Wahli, W. (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks, *Mol Endocrinol* 14, 329-347.
 48. Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 140-147.
 49. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions, *Cell* 59, 477-487.

-
50. Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies, *Biochemistry* 15, 672-680.
 51. Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1977) Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics, *Biochemistry* 16, 5546-5551.
 52. Zhu, B. T., Han, G. Z., Shim, J. Y., Wen, Y., and Jiang, X. R. (2006) Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding, *Endocrinology* 147, 4132-4150.
 53. Bouter, A., Le Tilly, V., and Sire, O. (2005) Interplay of flexibility and stability in the control of estrogen receptor activity, *Biochemistry* 44, 790-798.
 54. Boyer, M., Poujol, N., Margeat, E., and Royer, C. A. (2000) Quantitative characterization of the interaction between purified human estrogen receptor alpha and DNA using fluorescence anisotropy, *Nucleic Acids Res* 28, 2494-2502.
 55. Le Tilly, V., and Royer, C. (1993) Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor DNA binding, *Biochemistry* 32, 7753-7758.
 56. Ozers, M. S., Hill, J. J., Ervin, K., Wood, J. R., Nardulli, A. M., Royer, C. A., and Gorski, J. (1997) Equilibrium binding of estrogen receptor with DNA using fluorescence anisotropy, *J Biol Chem* 272, 30405-30411.
 57. Zargarian, L., Le Tilly, V., Jamin, N., Chaffotte, A., Gabrielsen, O. S., Toma, F., and Alpert, B. (1999) Myb-DNA recognition: role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-Myb, *Biochemistry* 38, 1921-1929.

58. Bouter, A., Buisine, N., Le Grand, A., Mouchel, N., Le Tilly, V., Wolff, J., and Sire, O. Control of vitellogenin genes expression by sequences derived from transposable elements in rainbow trout, *submitted for publication in Biochim Biophys Acta*.
59. Nettles, K. W., Bruning, J. B., Gil, G., O'Neill, E. E., Nowak, J., Guo, Y., Kim, Y., DeSombre, E. R., Dilis, R., Hanson, R. N., Joachimiak, A., and Greene, G. L. (2007) Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain, *EMBO Rep* 8, 563-568.
60. Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J. M., and Moras, D. (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors, *Breast Cancer Research* 2, 353-359.
61. Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 381-388.
62. Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* 389, 753-758.
63. Egea, P. F., Klaholz, B. P., and Moras, D. (2000) Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones, *FEBS Lett* 476, 62-67.
64. Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist, *EMBO Journal* 18, 4608-4618.
65. Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen, *Cell* 95, 927-937.

-
66. Heldring, N., Pawson, T., McDonnell, D., Treuter, E., Gustafsson, J. A., and Pike, A. C. (2007) Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors, *Journal of Biological Chemistry* 282, 10449-10455.
 67. Henttu, P. M., Kalkhoven, E., and Parker, M. G. (1997) AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors, *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.
 68. Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M. G. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA, *J Biol Chem* 272, 19858-19862.
 69. Peng, B., Lu, B., Leygue, E., and Murphy, L. C. (2003) Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms, *Journal of Molecular Endocrinology* 30, 13-29.
 70. Yoshida, M., Nishi, M., Kizaki, Z., Sawada, T., and Kawata, M. (2002) Subcellular and subnuclear distributions of estrogen receptor α in living cells using green fluorescent protein and immunohistochemistry, *Acta histochemica et cytochemica* 34, 413-422.
 71. Kosztin, D., Bishop, T. C., and Schulten, K. (1997) Binding of the estrogen receptor to DNA. The role of waters, *Biophys J* 73, 557-570.
 72. Schultz, J. R., Loven, M. A., Melvin, V. M., Edwards, D. P., and Nardulli, A. M. (2002) Differential modulation of DNA conformation by estrogen receptors alpha and beta, *J Biol Chem* 277, 8702-8707.
 73. Gee, A. C., and Katzenellenbogen, J. A. (2001) Probing conformational changes in the estrogen receptor: evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release, *Mol Endocrinol* 15, 421-428.

74. Furlow, J. D., Murdoch, F. E., and Gorski, J. (1993) High affinity binding of the estrogen receptor to a DNA response element does not require homodimer formation or estrogen, *J Biol Chem* 268, 12519-12525.
75. Bapat, A. R., and Frail, D. E. (2003) Full-length estrogen receptor alpha and its ligand-binding domain adopt different conformations upon binding ligand, *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 143-149.
76. Greenfield, N., Vijayanathan, V., Thomas, T. J., Gallo, M. A., and Thomas, T. (2001) Increase in the stability and helical content of estrogen receptor alpha in the presence of the estrogen response element: analysis by circular dichroism spectroscopy, *Biochemistry* 40, 6646-6652.
77. Vijayanathan, V., Greenfield, N. J., Thomas, T. J., Ivanova, M. M., Tyulmenkov, V. V., Klinge, C. M., Gallo, M. A., and Thomas, T. (2007) Effects of estradiol and 4-hydroxytamoxifen on the conformation, thermal stability, and DNA recognition of estrogen receptor beta, *Biochem Cell Biol* 85, 1-10.

II.2 Résultats complémentaires de l'article 2 : Liaison aux ligands et environnement moyen des résidus tryptophane au sein de hER α et hER β

II.2.1 Comparaison entre les deux isotypes du hER

La Figure 27 présente les spectres d'excitation (A) et d'émission (B) des résidus W au sein de hER α et hER β . Nous constatons que les spectres d'excitation comme les spectres d'émission de fluorescence des résidus tryptophane de hER α présentent une aire plus faible que ceux des résidus W de hER β . Ceci peut s'expliquer par le nombre différent de résidus W que possède chaque ER : 5 W pour hER α et 7 W pour hER β . En normalisant les spectres de hER α par rapport à hER β , nous constatons une parfaite superposition. Ceci suggère que les résidus W des deux isotypes se trouvent dans un environnement similaire.

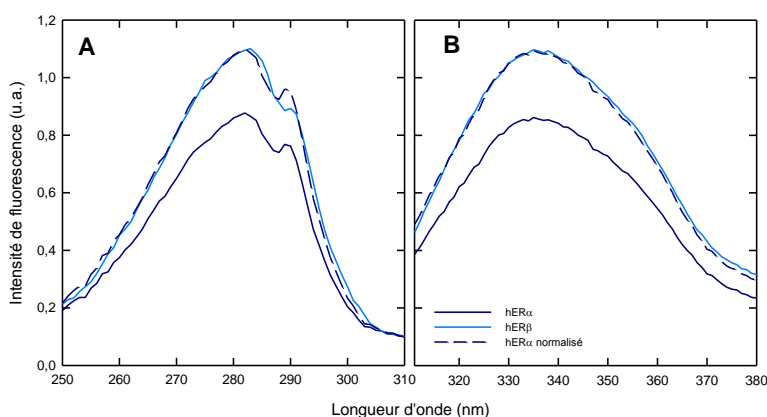


Figure 27 : Comparaisons des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des résidus W au sein de hER α et hER β .

Les spectres d'excitation de fluorescence (A) ont été réalisés pour une longueur d'onde d'émission de 338nm. Les spectres d'émission de fluorescence (B) ont été collectés en excitant l'échantillon protéique à une longueur d'onde d'excitation de 290nm et en récoltant l'émission entre 310 et 380 nm. Tous les spectres ont été réalisés à 10°C dans le tampon d'étude : 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 10% glycérol, 0,1mM EDTA, 1mM DTT ; [hER] = 5.10^{-8} M.

II.2.2 Impact des ligands

Afin de rechercher un effet ligand-spécifique sur le changement de conformation de hER α et hER β induit par la formation du complexe, nous avons réalisé les spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 290$ nm) et d'excitation ($\lambda_{emi} = 338$ nm) de fluorescence des résidus W retrouvés au sein des deux ER en présence des différents ligands testés : E2, DES, 4-OHT et

Ral. Les spectres d'excitation montrent systématiquement une baisse d'intensité de fluorescence après fixation du ligand. Ceci est cohérent avec les observations faites précédemment qui montraient que le temps de vie de fluorescence des résidus W au sein des hER est modifié par la fixation des ligands, indiquant une modification du rendement quantique de fluorescence.

Afin de mettre l'accent uniquement sur les changements de forme des spectres et sur les déplacements des longueurs d'onde d'émission maximales (λ_{em}^{max}), tous les spectres ont été normalisés par rapport à la λ_{em}^{max} des résidus W du hER non ligandé : 338nm (Figure 28).

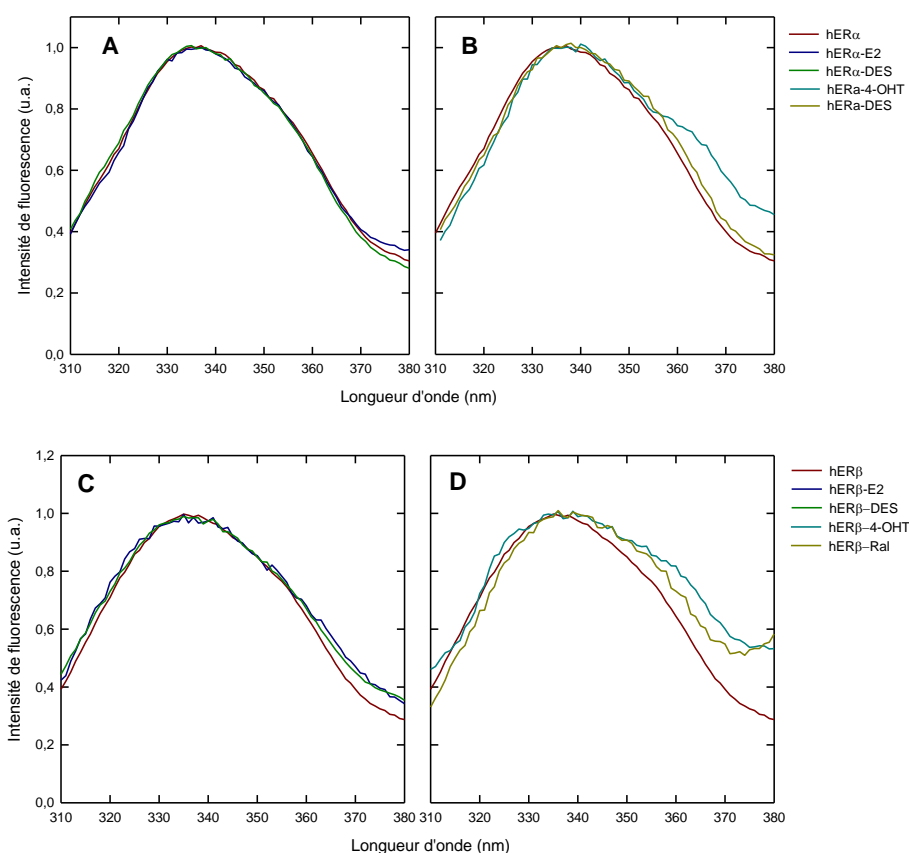


Figure 28 : Normalisation des spectres d'émission de fluorescence des W au sein de hERα (A,B) et hERβ (C, D) seuls ou liés aux œstrogènes (A et C) ou ou anti-œstrogènes (B, D).

Les spectres d'émission de fluorescence ont été réalisés en excitant l'échantillon protéique à une longueur d'onde d'excitation de 290nm et en récoltant l'émission entre 310 et 380 nm. Tous les spectres ont été réalisés à 10°C dans le tampon d'étude : 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycérol, 0,1mM EDTA, 1mM DTT ; [hER] = 5.10^{-8} M et [ligand] = 10^{-7} M.

La normalisation des spectres d'émission de fluorescence des résidus tryptophane nous permet d'observer que, quelque soit l'isotype du récepteur aux œstrogènes, sa liaison à un œstrogène (E2 ou DES) ne modifie pas l'environnement moyen des résidus tryptophane. En

revanche, la fixation aux anti-œstrogènes aux hER (4-OHT ou Ral) modifie l'allure des spectres ainsi que la λ_{em}^{max} est modifiée. En présence de 4-OHT, les spectres d'émission de fluorescence présentent une bande caractéristique du 4-OHT (vers 365 nm) ainsi qu'un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale de 1 nm par rapport à celle obtenue en absence de ligand. La complexation des hER avec Ral a pour effet de déplacer la λ_{em}^{max} de 1 nm vers les grandes longueurs d'onde. De plus, contrairement à hER α -Ral, le spectre de hER β -Ral est plus large, suggérant que la fixation au raloxifène module différemment l'environnement moyen des résidus W de hER β comparé à celui des W de hER α .

Tous ces résultats tendent à suggérer que l'environnement moyen des résidus W au sein des ER liés à un anti-œstrogène est plus polaire que lorsque les ERs sont seuls ou liés aux œstrogènes.

II.3 Discussion du chapitre 2

Afin d'évaluer l'impact des paramètres physico-chimiques sur l'interaction entre les récepteurs aux œstrogènes et les ERE, nous avons réalisé des courbes d'anisotropie de fluorescence en présence de différentes concentrations en sel. Nous montrons que, comme ce qui a été précédemment rapporté pour hER α (Bouter *et al.*, 2005), le complexe hER β -ERE est stabilisé principalement par des interactions électrostatiques. Nos résultats montrent également que le complexe formé entre le récepteur et un ERE_{cs} est plus fort et moins sensible au sel que celui formé entre hER β et un ERE imparfait (*rtvtgERE*). Ceci suggère que la nature et le nombre d'interactions électrostatiques stabilisant ces complexes sont différents. D'autre part, quelle que soit la concentration saline, l'affinité de hER α pour la séquence ERE est toujours plus importante que celle de hER β . Cette différence pourrait expliquer que les activités cellulaires mesurées pour hER β sont plus faibles que celles de l'isotype α (Mosselman *et al.*, 1996; Pettersson *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998a; Cowley et Parker, 1999; Hall et McDonnell, 1999; Hanstein *et al.*, 1999).

D'autre part, nos résultats montrent que la flexibilité de hER β , déduite de l'accessibilité dynamique des résidus tryptophane, dépend de la concentration saline : plus la concentration saline est importante, plus la flexibilité de la protéine est amoindrie. Un même résultat a déjà été obtenu pour hER α (Bouter *et al.*, 2005). Nos résultats sont cohérents avec une conformation moins structurée pour hER β comparé à hER α . En effet, des études menées en

dichroïsme circulaire dans l'UV lointain ont montré que les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humains présentent des structures secondaires distinctes : hER α est plus structuré en hélices- α que hER β (Greenfield *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2005; Vijayanathan *et al.*, 2007). Nous suggérons que la plus forte structuration de l'isotype α serait principalement due à un fort réseau de liaison H telles que l'attestent nos expériences menées à différentes concentrations salines. Ces niveaux de structuration pourraient expliquer pourquoi seul l'isotype α puisse induire une courbure de l'ADN.

L'étude sur la stabilité thermique des deux récepteurs montre que la stabilité conformationnelle de hER α est plus importante que celle de hER β . Il est important de noter que seule la stabilité conformationnelle de hER α est modulable par la concentration saline, ce qui démontre à nouveau que la plus grande stabilité conformationnelle de cet isotype repose étroitement sur son réseau électrostatique. Ces résultats complètent les études publiées par Greenfield et collaborateurs et confirment la conformation moins structurée de hER β comparée à celle de hER α (Greenfield *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2005; Vijayanathan *et al.*, 2007). Ces auteurs ont également rapporté que la stabilité thermique de hER était augmentée à la suite de la fixation du ligand (E2, 4-OHT et ERE). D'autre part, les valeurs de T_M indiquent qu'à la température physiologique (37°C), les deux hERs non complexés ont une conformation instable. Ceci doit nécessairement avoir des conséquences importantes pour leur fonctionnalité dans le contexte cellulaire ce qui pourrait mettre en lumière un rôle « chaperon » des complexes transitoires.

L'étude de l'impact des ligands sur la flexibilité de hER α et hER β montre que les deux protéines deviennent plus contraintes lorsqu'elles sont complexées au ligand et ce, quelque soit le ligand. D'autre part, nous montrons que la flexibilité conformationnelle des récepteurs ne permet pas de différencier les œstrogènes des anti-œstrogènes.

Nos résultats ont montré des modifications spectrales d'émission de fluorescence des résidus W au sein des hER observées en absence et en présence de ligands qui pourront être exploitées ultérieurement pour mesurer les constantes cinétiques d'association ou de dissociation des différents ligands des hER.

Ainsi une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques des deux récepteurs aux œstrogènes humains mesurées *in vitro* doit permettre une meilleure compréhension du comportement et du rôle de chaque récepteur dans le contexte cellulaire. Cette connaissance est indispensable pour le développement de nouveaux médicaments pour soigner le cancer du sein.

III. Chapitre 3 : Impact des ligands sur les propriétés et la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes

III.1 Introduction à l'article 3 intitulé "Differential functional properties and sub-cellular localization of human and rainbow trout estrogen receptors in response of estrogens and anti-estrogens"

Les œstrogènes, *via* le récepteur aux œstrogènes (ER), jouent un rôle important dans la régulation de la transcription de gènes impliqués dans de grandes fonctions biologiques. Le récepteur aux œstrogènes est capable de fixer un grand nombre de ligands qui sont des œstrogènes, anti-œstrogènes, phyto-œstrogènes, SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*).

Deux récepteurs aux œstrogènes, issus de l'expression de gènes distincts, sont retrouvés chez l'homme : hER α et hER β . Chez la truite arc-en-ciel, deux isoformes de ce récepteur coexistent : il s'agit de protéines résultant de l'épissage alternatif d'un même gène ou de l'utilisation de promoteurs différents. Ces récepteurs sont notés rtER_S (forme tronquée à l'extrémité N-terminale) et rtER_L (forme longue).

Au laboratoire a été mis au point un outil génétique permettant de mesurer l'activité cellulaire du hER α et rtER_S *via* des mesures de *trans*-activation du gène *LacZ* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. N'ayant pas à notre disposition les outils nécessaires à l'expression de hER β et rtER_L, notre étude s'est focalisée sur hER α et rtER_S.

hER α et rtER_S présentent au niveau du domaine de fixation du ligand (LBD, domaine E), une forte identité de séquence en acides aminés de l'ordre de 60%. Des études antérieures ont montré que contrairement au hER α , rtER_S possède une activité cellulaire importante indépendante de la présence d'hormone. La comparaison des LBD a permis de mettre en évidence deux résidus aminoacides du site de fixation du ligand, divergeant entre les récepteurs des deux espèces : L349, M528 pour hER α et M317, I496 pour rtER_S (Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999). Ces substitutions conduisent à un récepteur présentant une plus faible affinité pour son ligand, K_D rtER_S-E2 = 1,35 nM et K_D hER α -E2 = 0,35nM, et un phénomène de *trans*-activation moindre que celui de hER α en présence d'hormone (Wooge *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 2001).

D'après la littérature, en l'absence d'hormone, hER α est retrouvé majoritairement dans le noyau (~10 % dans le cytoplasme et 90 % dans le noyau). En réponse à E2 ou au 4-

hydroxytamoxifène (4-OHT), la répartition de la protéine est modifiée : 4 % cytoplasmique et 96 % nucléaire (Htun *et al.*, 1999; Stenoien *et al.*, 2000a). Une étude précédente menée par Matsuda et collaborateurs a montré que la localisation des récepteurs aux œstrogènes humains étaient identiques pour les isotypes α et β : localisation du récepteur fusionné à la GFP exclusivement nucléaire et formation de *foci* fluorescents après addition de E2. Ils ont aussi montré que lorsque les deux isotypes fusionnés à la CFP ou YFP (*Cyan* ou *Yellow Fluorescent Protein*, deux variants de la GFP), sont exprimés dans la même cellule, une parfaite colocalisation des deux fluorophores est observée (Matsuda *et al.*, 2002). Une étude antérieure menée au sein du laboratoire a montré que le rtER_S est uniformément réparti dans la cellule et subit, sous stimulus hormonal, une relocalisation en faveur du noyau.

L'objectif de cette étude *in vivo* a consisté d'une part à analyser, la réponse de hER α et de rtER_S vis-à-vis de 5 ligands différents : deux œstrogènes (17 β -œstradiol, E2 et diéthylstilbestrol, DES) et 3 anti-œstrogènes (4-hydroxytamoxifène, 4-OHT, Raloxifène, Ral et ICI 182780, ICI). Cette réponse hormonale a également été suivie dans le temps. D'autre part, nous nous sommes intéressés à suivre la localisation subcellulaire de ces récepteurs. Pour cela, les récepteurs aux œstrogènes ont été préalablement fusionnés à la GFP.

**Differential functional features and sub-cellular
localization of alpha human and rainbow trout estrogen receptors
in response of estrogens and anti-estrogens**

**Adélaïde LE GRAND, Anthony BOUTER^a, Véronique LE TILLY*, Odile MULNER-
LORILLON^b, Xavier LE GOFF^c, Franck CHESNEL^c and Olivier SIRE**

Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux de Bretagne, Université de Bretagne-Sud,
CER Yves Coppens, BP573, 56017 Vannes CEDEX, France

*^acurrent address: Molecular Imaging and NanoBioTechnology, UMR 5248 CBMN, CNRS-Université
Bordeaux 1-ENITAB, IECB, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France.*

*^bpresent address :UPMC Univ Paris 06, UMR 7150 Mer et Santé, Equipe Traduction, Cycle
Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France.*

*^cpresent address: CNRS/Université de Rennes 1, Institut de Génétique & Développement, UMR 6061,
Faculté de Médecine, 2 Ave. Prof. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France.*

** Corresponding author:* Tel: 33 297 017 135. Fax. 33 297 017 071.

E-mail address: letilly@univ-ubs.fr (V. Le Tilly)

Keywords: estrogen receptor, sub-cellular localization, confocal fluorescence microscopy, transcriptional activity.

Abbreviations: E2, 17 β -estradiol; E_s, estrogens; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; LBD, ligand-binding domain, DBD DNA-binding domain; ERE_{cs}, consensus estrogen response element; hER α , human estrogen receptor alpha subtype; rtER α _s, short isoform of alpha subtype of rainbow trout estrogen receptor; MCF-7, human breast adenocarcinoma cell line; AF-1, activation function 1; AF-2, activation function 2; RAL, raloxifene; DES, Diethylstilbestrol, 4-OHT, 4-hydroxytamoxifen; ICI, ICI 182-780; *rtvtgERE*, ERE found in the intergenic region of the rainbow trout vitellogenin gene. GFP, Green fluorescent protein.

Acknowledgements : This work was financially supported by Le Comité du Morbihan de la Ligue Nationale Contre le Cancer. Authors thank Gilles Salbert for scientific discussion.

ABSTRACT

Estrogens are steroid hormones that play a pivotal role in growth, differentiation and function of reproductive and non-reproductive tissues, mediated through estrogen receptor (ER). Estrogens are involved in different genomic and non genomic cell signaling pathways as gene transcription activation and MAPK signaling pathway activation. These estrogens-dependent cellular responses require a well-defined sub-cellular localization of ER.

In order to understand structure/function/sub-cellular distribution relationship of ER, our study was carried out with two ERs exhibiting distinct structures and differential functional properties: human ER α subtype (hER α) and short isoform of rainbow trout ER α form (rtER α_S). Thus, we have measured cellular activity and determined sub-cellular localization of both ERs, in response to agonists (estradiol or diethylstilbestrol) and antagonists (4-OH tamoxifen, raloxifen and ICI 182-780), within similar cellular context, namely in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. Green fluorescent protein (GFP) was fused to both ERs to study their compartmentation. Un-tagged and tagged estrogen receptors are able to activate gene transcription in yeast and exhibit a similar transcriptional activation by ligands. However, a reduction of activity is observed with GFP estrogen receptor compared to un-tagged receptor. Besides, the sub-cellular localization of both ERs, evaluated through the fluorescence intensity of GFP, is different: in absence of estrogen ligands, hER α seems to be mainly localized in the nucleus, whereas rtER α_S is diffusely distributed within the whole yeast cell. This sub-cellular localization is affected by the presence of ligands: hER α and rtER α_S are then found within many distinct nuclear or cytoplasmic foci, respectively. To date, the structure of these foci is not known.

It clearly appears that comparative studies, performed with distinct structural and functional estrogen receptors but in a unique cellular environment, are essential for a better knowledge of the cellular signalling pathways involved in ER-regulated gene expression.

INTRODUCTION

Estrogens are steroid hormones that play an important role in growth, differentiation and function of reproductive and non-reproductive tissues. Most of their actions are mediated through estrogen receptors (ER) belonging to the superfamily of the nuclear receptors. Upon hormone binding ER regulates the transcription of specific, cell type-dependent, genes.

The estrogen receptor, widely expressed in eukaryotes, is mainly present in two subtypes, namely ER α and ER β (1-10). These two ER subtypes, encoded by two different genes and expressed in many tissues, exhibit distinct tissue-specific expression levels and distinct functional and biological properties (3, 11-18); For each subtype, different isoforms may be generated from either alternative exon splicing or presence of different promoters on a same gene and activation of a given promoter, or genome duplication (16, 19-22). In human, at least four α isoforms and five β isoforms of ER have been found (23-25). In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), two isoforms for each ER subtype have been identified, namely rtER α 2, rtER α 1, rtER β 1 and rtER β 2 (6, 21-22, 26-27).

All ERs share a common structural organization with 6 structural domains (designated as A-F domains), more or less conserved among all ERs from different species and which exhibit different functions. Two distinct transcriptional activation functions (AFs) are located in the NH₂-terminal A/B region (named AF-1) and the COOH-terminal E region (named AF-2) of ER. AF-1 is responsible for the ligand-independent transactivation, whereas the AF-2 activity depends on ligand-binding. AF-1 activity depends on the phosphorylation state of Ser118 residue (28). Additionally, AFs activity is modulated by recruitment of coregulators (29-33). Both AFs may act independently or in a synergistic manner, leading to maximal ER transcriptional activity (34). The C domain, also called DNA-binding domain (DBD), the highest conserved ER domain, comprises 2 zinc fingers followed by a sequence rich in basic amino-acid residues. This domain specifically interacts with cognate DNA sequences, called

estrogen responsive elements (ERE); these motifs can be the consensus palindromic ERE sequence, AGGTCA_{nnn}TGACCT, but also imperfect EREs or ERE half-sites. The E domain contains not only AF-2 but also the ligand-binding domain (LBD) and a strong dimerization interface. Finally, D domain is a flexible linker peptide between the DBD and the LBD, and the F domain is considered as a COOH-terminal extension of the LBD.

It is well established that ER acts as an estrogens-activated transcriptional factor and modulates gene expression by directly binding to ERE DNA sequences located in target genes promoters or by interacting with other transcriptional factors (25). The classical model of estrogen action indicates that upon estrogen binding, receptors are released from inactive complexes containing heat-shock proteins and immunophilins (35), dimerize and can thereafter bind specific DNA ERE motifs (36-37). ERE-bound ERs then recruit a series of coactivators such as the p160 coactivators and CREB-binding protein (31, 38-41). These ER-coactivators complexes may modulate the chromatin structure and facilitate access of the transcriptional machinery to DNA (42-43). Other mechanisms of estrogen action have been proposed in which ERs-regulated gene transcription is due to protein-protein interactions with other classes of transcription factors, and/or with components of other signalling cascades. Control of gene transcription requires a nuclear localization of ER. Thus, the import of ER into the nucleus is an additional way of gene expression regulation.

In this study, we have compared the functional properties of two estrogen receptors, hER α and rtER α_S . hER α (595 amino acid residues) and rtER α_S (575 amino acid residues) exhibit a low sequence homology (41.6%). The DBD and LBD are the most conserved domains, 92% and 60% respectively. hER α and rtER α_S specifically bind estradiol with a high affinity; although, rtER α_S exhibits a 10-fold reduced estradiol affinity compared to hER α (44). Both stimulate transcription of genes containing an ERE in response to estradiol binding, whereas rtER α_S also activates these genes even independently of ligand binding.

Thus, to understand how the structure of estrogen receptors influences their functional properties, we measured cellular activity and determined sub-cellular localization of two receptors, hER α and rtER α_S , in response to agonists, estradiol and diethylstilbestrol, and antagonists, 4-OH tamoxifen, raloxifen (2 known partial antagonists in human cells) and ICI 182-780 (pure antagonist in human cells), within similar cellular context. Since previous studies have reported that expressed hER α and rtER α_S in *Saccharomyces cerevisiae* were able to enhance gene transcription from yeast promoters linked to consensus estrogen-responsive elements (ERE) in response to estradiol (44), our present study was carried out with this unique heterologous cellular system. Hence, the use of yeast system allows us to compare the interaction between different ligands and two estrogen receptors, structurally different and coming from 2 distinct vertebrate organisms without confounding influences found in these latter systems. For our study, experiments were performed using un-tagged and GFP-tagged estrogen receptors. For transactivation experiments, we have used a β -galactosidase reporter vector containing 2 consensus ERE sequences (ERE_{cs}) in its promoter sequence. Our results show that un-tagged and tagged estrogen receptors exhibit a similar ligand-dependent transcriptional activation in yeast. However, a loss of activity is observed with GFP estrogen receptor compared to un-tagged receptor. Besides, the sub-cellular localization of both estrogen receptors, hER α and rtER α_S , evaluated from the fluorescence intensity of GFP, is different: in absence of estrogens, hER α seems to be mainly localized in the nucleus, whereas rtER α_S is diffusely distributed within yeast cell. This sub-cellular localization is affected by the presence of ligands: hER α and rtER α_S are found within many of distinct nuclear foci and cytoplasmic foci, respectively.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

The steroid compounds used in this study, E2, DES, 4-OHT and RAL, were purchased from Sigma (Paris, France) and solubilized in ethanol except for RAL and ICI which were solubilized in DMSO. The steroid solution stock concentration was 10^{-2} M.

Plasmids

ER expression vectors and β -galactosidase reporter vector

The construction of expression plasmids of hER α and rtER α_S has been previously described (45). To construct expression plasmids of recombinant chimeric GFP-hER α and GFP-rtER α_S proteins, the hER α and rtER α_S cDNA was PCR-amplified from YEPE15 (46) and pCMV5/rter α_S (47) respectively, and subcloned into a modified pBluescript SK phagemid (Stratagene). The subclonings of her α and rter α_S were realized between *Eco*RI and *Sac*I restriction sites. Resulting plasmids were designated as pBKher α and pBKrter α_S . Then GFP cDNA was amplified by PCR from pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) and subcloned into pBKher α and pBKrter α_S between *Eco*RI and *Bam*HI, upstream of the ER sequences. The unique *Bam*HI site is present into the sense primers used for her α and rter α_S amplification. The reverse primer used for GFP amplification has been designed so that the stop codon has been mutated from TAA to GGA in order to allow translation of the complete recombinant fusion proteins. Finally resulting plasmids pBKgfpher α and pBKgfprter α_S were fused to pYeDP60-*AQPcic* (48) with *Sac*I. Correct fusion plasmids were digested by *Eco*RI and the products were ligated in order to obtain the pY60gfpher α and pY60gfprter α_S vectors.

Thus, all constructed plasmids contain the yeast ura and the bacterial amp^R selection markers. Additionally, in each case, expression hER α or rtER α_S , fused or not with GFP, is

under the control of a GAL10-cyc promoter and can be induced by addition of galactose (to a final concentration 2% (w/v)) in the yeast culture medium.

Reporter vector

β -galactosidase reporter vector, YRPE2, contains 2 consensus ERE sequences (ERE_{cs}) located upstream of a minimal *cyc* promoter controlling the *lacZ* gene expression (45, 49). This plasmid was kindly provided by Pr. O'Malley.

Cell culture and transient expression assays

Saccharomyces cerevisiae yeast, cell which lacks endogenous estrogen receptors, was transformed with appropriate expression and reporter plasmids. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain W303.1B (α , leu2, his3, trp1, ura3, ade2-1, can^R, cyr+) was grown in rich medium YPRE (2% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% raffinose, pH 7 and 3% ethanol) or selective medium (0.67% nitrogen base without amino acids, 1% raffinose or 2% glucose, pH 5.8, plus drop out supplements : DO-Ura or DO-Ura-Leu). Yeast cells were transformed with reporter plasmid and/or expression plasmids using the lithium acetate chemical method (Yeast protocols handbook, Clontech). Transformed yeast cells were grown in the selective medium SD/-Ura (expression plasmids) or SD/-Ura-Leu (expression plasmids/YRPE2) at 150 rpm rotative shaking and at 30°C up to $OD_{600nm, l=1cm} = 1$ and diluted 10 times into YPRE medium. They were grown again to $OD_{600nm, l=1cm} = 0.5$ before induction with 2% galactose, and/or hormonal stimulation with ligands. Cells were then further grown for 16h before analyses. Ligand concentrations from 10^{-10} to 10^{-5} or 10^{-4} M were tested.

Protein extracts and Western Blot analysis

For SDS-PAGE, yeast extracts of pY60er_s and pY60gfper_s transformants, were denatured by boiling for 5 min in a SDS loading buffer containing 15% β -mercaptoethanol

and centrifuged during 3 min at 8000 rpm to eliminate cell debris. Proteins were separated by electrophoresis on a denaturing 10%-polyacrylamide gel and electrotransferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membrane. Membrane was incubated in TBS solution (10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 8) containing 0.1% Tween 20 and 5% low fat milk overnight at 4°C. Nitrocellulose membrane was then washed twice for 10 min with TBS containing 0.05% Tween 20 (TBST) and then incubated, for 2h at room temperature, with primary antibody, 1/1000 diluted in TBS containing low fat milk at 2%. The expression of hER α , fused or not with GFP, was assessed by using a specific anti-hER α (LabVision) or anti-GFP (Invitrogen) antibodies. To determine the presence of rtER α_s , fused or not with GFP, we have used a specific anti-rtER- α (50) or anti-GFP antibodies. After five 10-min washes with TBST, the membrane was incubated for 2h with secondary horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody at a dilution of 1/6000 in the same solution as the primary. Then the membrane was washed as described above and incubated for 20 min with commercially supplied chemiluminescent reagents (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific). X-ray films were developed after 1 to 30 min exposure.

β -galactosidase assay

β -galactosidase assay was performed as previously described (51). Yeast cells were harvested and resuspended in 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7. The $OD_{600nm, l=1cm}$ value was monitored. After permeabilization with 1/20 volume of acetone:toluene (9:1) for 15 min at 30°C, ONPG was added to a final concentration of 0.47 mg/mL. The reaction was stopped by adding Na₂CO₃ to a final concentration of 0.3 M. After centrifugation, the $OD_{420nm, l=1cm}$ value of the supernatant was monitored. The β -galactosidase activity (*Activity*) was expressed in Miller units

according to:

$$Activity = \frac{1000 \times OD_{420nm, l=1cm}}{t \times V \times OD_{600nm, l=1cm}} \quad (1)$$

with t , the time of reaction (min) at 30°C and V the culture volume used for the assay (0.05 mL). Displayed values are the means of at least 3 independent experiments.

The data of the dose-response curves have been fitted according to the Hill equation from which the recovered value of EC_{50} was extracted:

$$Activity = Activity_{[L] \rightarrow 0} + \frac{a \times [L]^n}{EC_{50} + [L]^n} \quad (2)$$

To quantify the antiestrogenic effect, agonist concentration used was 10^{-7} M.

Fold induction or repression values were calculated using the following equation:

$$Fold = \frac{Activity_{[L]_{max}}}{Activity_{[L] \rightarrow 0}} \quad (3)$$

Confocal fluorescence microscopy

Yeast cells, grown as previously described, were pelleted and then resuspended in PBS. Nuclear chromatin and membrane double-staining was obtained after incubating yeast cells for 10 min at room temperature with DRAQ5 (50 μ M) then with FM4-64 (10 μ M). Multi-track images were performed; GFP signal was observed by exciting at 488 nm (laser argon) and by collecting emitted photons with a 505/550 bandpass emission filter; FM4-64 probe was excited at 543 nm (laser HeNe) and emission was monitored with a 560LP filter; DRAQ5 probe was excited at 633 nm (laser HeNe) and emission was collected with a 650LP filter. Cells were observed using a Zeiss LSM510 laser scanning microscope with a 40X 1.3 N.A. water immersion objective lens.

RESULTS

ER-regulated genes transcription in response to estrogens requires several parameters: (i) multiple molecular interactions with *trans*- and *cis*-acting factors leading to post-translational modifications, conformational changes, (ii) chromatin decondensation, (iii) localization of ER and other interacting proteins, (iv) nuclear translocation and (v) time (52). Our study is focused on the comparison of the cellular activity of two distinct ERs, the alpha form of the human estrogen receptor (hER α) and the short isoform of the alpha form of the rainbow trout (rtER α_S), in response to several estrogenic and antiestrogenic ligands. For this study, we used a unique expression system, namely *Saccharomyces cerevisiae*. In parallel to measuring these cellular activities, we have monitored the sub-cellular localization of both ERs in response to ligands.

hER α and rtER α_S activate gene transcription in yeast

Transcriptional activities of hER α and rtER α_S were monitored in yeast by using cells co-transfected with expression galactose-inducible plasmid, pY60her α or pY60rter α_S , and reporter plasmid, YRPE2, containing 2 tandem copies of the consensus ERE linked to the yeast *cycl* promoter located upstream of the *E. coli lacZ* gene, coding for β -galactosidase. Thus, the ER transactivation activity can be determined through the measurement of β -galactosidase activity (Figure 1). To confirm that the activity measured is really due to ER, a control experiment was performed with co-transfected cells in absence of ER induction (data not shown). In this case, with or without E2 stimulation, no β -galactosidase activity was detected (data not shown). An identical result was obtained either with un-transformed *S. cerevisiae* or transformed yeast expressing aquaporin (unrelated to ERE mediated

transcriptional control) alone. Whatever the conditions, with or without induction, in the absence or in the presence of E2 stimulation, no β -galactosidase activity was detectable.

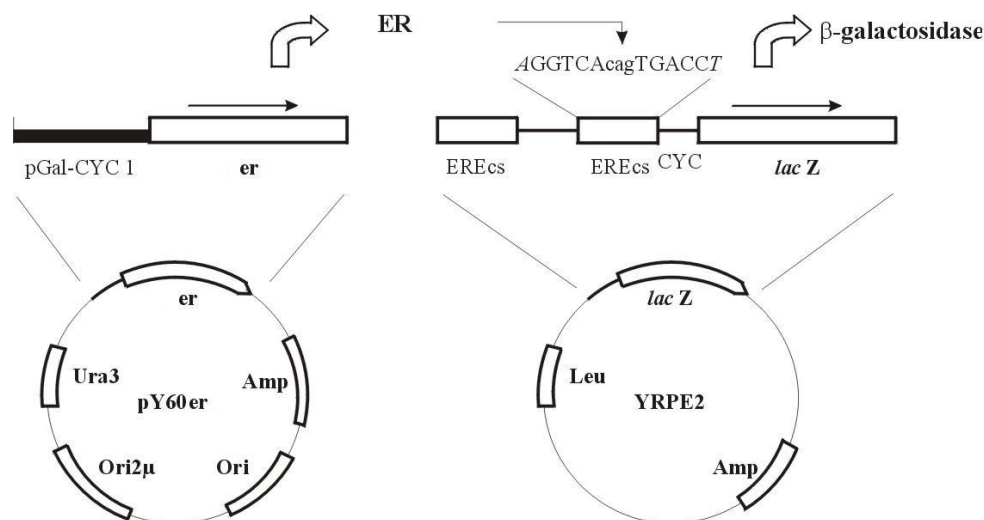


Figure 1: Yeast ER expression plasmid, pY60er, and β -galactosidase reporter vector, YRPE2. Schematic view of ER transcriptional activity measurements: ER, expressed under the control of the GAL10-CYC1 promoter, binds to consensus ERE sequences (ERE_{cs}) located upstream of a minimal *cyc* promoter controlling the *lacZ* gene expression. Amount of β -galactosidase synthesized thus reflects ER transcriptional activity.

Cellular activities of both ERs, in yeast, were monitored in the absence and in the presence of E2 at 10^{-7} M (Figure 2A). After induction (*via* galactose supplementation of culture medium) and in the absence of hormonal stimulation, a β -galactosidase activity was only detected in rtER α_S -expressing cells. It means that, while hER α transactivation activity depends only on the presence of ligand, rtER α_S exhibits an independent-ligand transcriptional activity as previously observed in other yeast strains or mammalian cells (44, 53-55). After induction and E2 stimulation (10^{-7} M), in our cellular system, the activity of hER α is highly increased (25-fold) whereas that of rtER α_S is twice that measured after induction without hormonal stimulation.

Thus, our results show that hER α and rtER α_S receptors are functional in living *Saccharomyces cerevisiae*. Additionally, rtER α_S and hER α are efficient transcriptional

factors with a lesser efficiency for $\text{rtER}\alpha_S$ compared to $\text{hER}\alpha$. These two ERs exhibit different functional properties. In particular, $\text{hER}\alpha$ activates gene transcription in presence of ligand whereas activation by $\text{rtER}\alpha_S$ can also occur in absence of ligand.

For visualizing ERs subcellular trafficking and localization *in cellulo* and in real time, we have constructed an inducible expression vector for green fluorescent protein (GFP)-tagged ERs (see Materials and Methods section) and needed first to ascertain the functionality of both GFP-tagged ERs. Same transcriptional activity measurements were thus performed with the two GFP-tagged ERs (Figure 2B) and led to similar results. GFP- $\text{hER}\alpha$ and GFP- $\text{rtER}\alpha_S$ exerted a ligand-dependent transcriptional activity and only GFP- $\text{rtER}\alpha_S$ possessed an independent–ligand transcriptional activity. These activities were nevertheless lower than that for untagged ER.

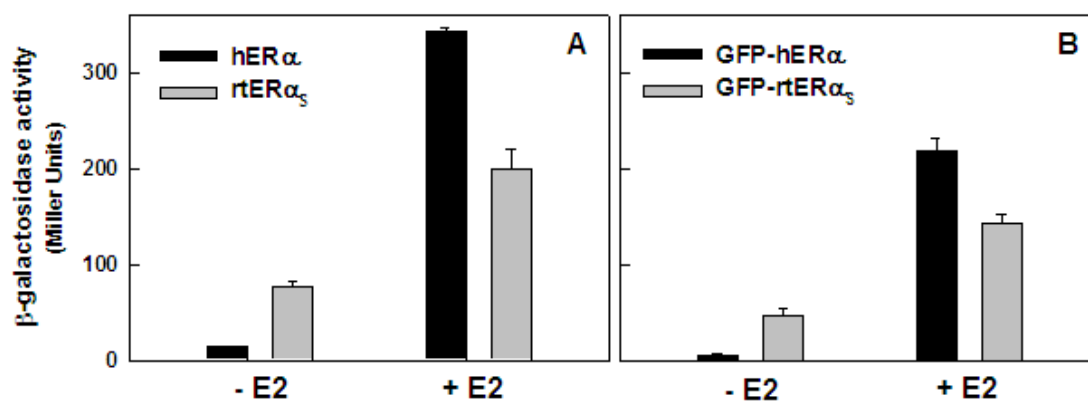


Figure 2: E2-dependent enhancer activity of un-tagged and GFP-tagged $\text{hER}\alpha$ and $\text{rtER}\alpha_S$ in *Saccharomyces cerevisiae*. Cells were co-transformed with pY60(gfp)hera (black bar charts/histograms) or pY60(gfp)rter α_S (grey bar charts/histograms) expression vectors and the β -galactosidase reporter vector YRPE2. The recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and then induced with 2% of galactose and stimulated or not with 10^{-7} M of E2. After 16h of incubation, β -galactosidase activity was measured. Values represented a mean of at least three independent experiments.

Agonists for hER α and rtER α_S activation of transcription in *S. cerevisiae*

Different estrogenic and antiestrogenic ligands were tested for their ability to activate ER-induced transcription. These include 2 pure agonists, E2 and DES, 2 partial antagonists, 4-OHT, RAL, and 1 pure hER α antagonist, ICI (ICI 182-780). To do so, we have measured activation of β -galactosidase transcription after treatment with ligands at various concentrations. ERs-induced transcriptional activities for each ligand dose are displayed in Figure 3. From these dose-response curves, two parameters were deduced: potency of ligand (EC₅₀) and its efficiency for the transactivation process (fold induction).

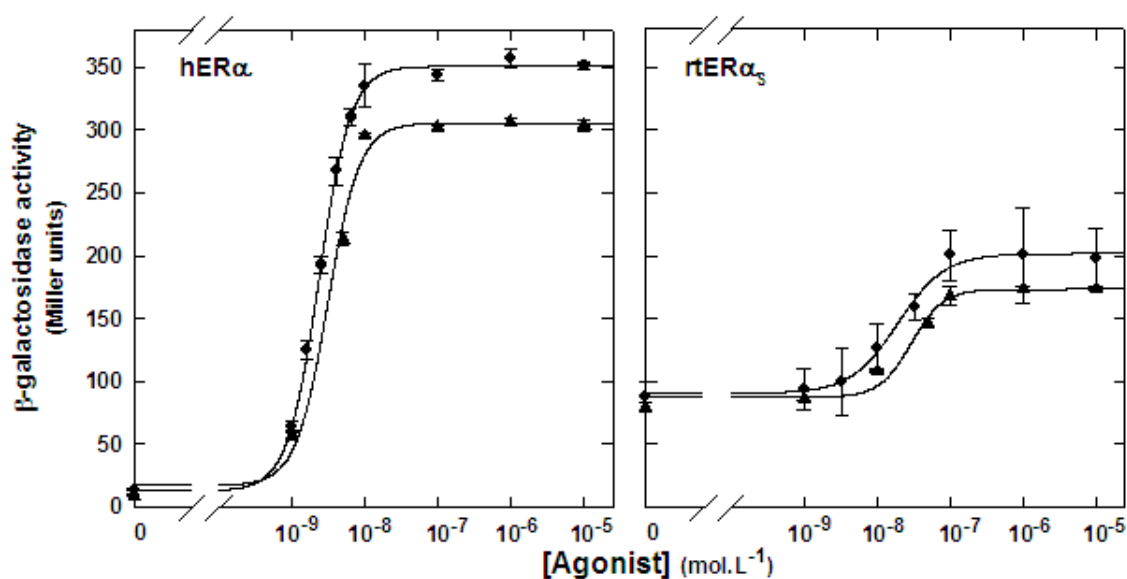
Whatever the estrogen used, hER α always exhibits a higher cellular activity than rtER α_S (Figure 3A and Table 1). Additionally, whatever the ER, hER α or rtER α_S , cellular activity measured in presence of E2 is slightly higher than that observed in presence of DES. This result suggests that DES acts as an efficient inducer of hER α and rtER α_S activity. Whatever the estrogen receptor, a similar EC₅₀ value for both tested agonists is measured. This indicates that both estrogen receptors have similar affinities for estradiol and diethylstilbestrol. This result is concordant with ligand-binding affinities previously measured *in vitro* (56). Besides, whatever the tested ligand, the dose-response curve of hER α is shifted towards the lower ligand concentrations compared to that of rtER α_S . Thus, the transcriptional activation by E2 or DES of rtER α_S requires a higher agonist concentration than that of hER α . This result suggests that rtER α_S has a lower estradiol and diethylstilbestrol affinity than hER α , as shown by the 10 time lower EC₅₀ (whatever the agonist) of the human receptor compared to the trout one (Table 1A).

To examine whether 4-OHT, RAL (2 known partial antagonists for human cells) and ICI (pure antagonist for human cells) exerted similar effects on rtER α_S and hER α expressed in yeast cells, we measured the cellular activity of both receptors in the presence of increasing concentrations of each antiestrogen (Figure 3B). Our results show that, whatever the ER, 4-

OHT and RAL stimulate ER activity. Thus, 4-OHT and RAL exert agonist effect on both ERs, whereas ICI exerts an agonist activity towards rtER α_S only. Additionally, 4-OHT is more potent than RAL towards hER α , whereas ICI is more potent than 4-OHT for rtER α_S (Table 2A).

To confirm that GFP tag fused on the NH₂-terminal extremity of ERs does not affect the functional properties of ERs, same experiments were performed using the two GFP-tagged ERs in presence of different ligand concentrations (Figure 4). As shown in Table 1B, E2 and DES retain their same high affinity for hER α and rtER α_S fusion proteins. Additionally, GFP-ERs behave as ERs: GFP-hER α exhibits a higher cellular transcriptional activity and a lower EC₅₀ value than GFP-rtER α_S , whatever the tested agonist was. We also notice that GFP-ERs display a maximal transcriptional activity higher in presence of E2 compared to that measured in presence of DES. E2 is therefore the most efficient agonist, as shown with the untagged ERs. Besides, whatever the antagonist used in this study, GFP-tagged and un-tagged ERs exhibit similar EC₅₀ values (Tables 1B and 2B).

A.



B.

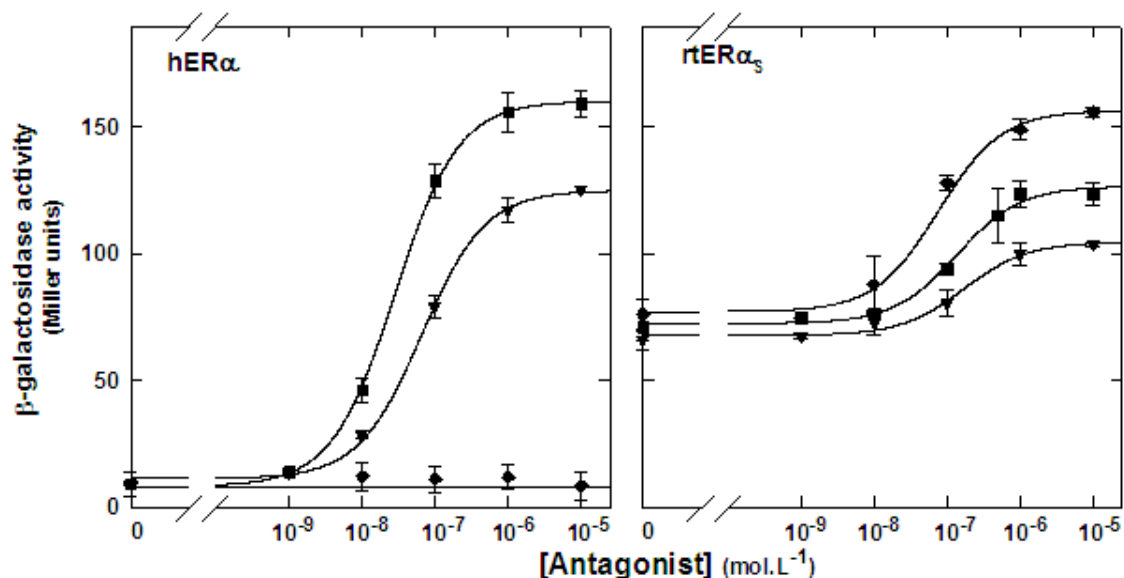


Figure 3: Agonist effect of ligands on functional properties of hER α and rtER α_s . Yeast cells co-transformed with either pY60her α or pY60rter α_s expression vector and the β -galactosidase reporter vector YRPE2. Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose and treated with different ligand concentrations (●, E2; ▲, DES; ■, 4-OHT; ▼, RAL; ◆, ICI). β -galactosidase activity was measured after 16h hormonal stimulation. Results are expressed as dose-response curves, each value representing the mean of at least three independent experiments.

Table 1: Effects of E2 and DES on transcriptional activity of ERs and GFP-ERs.**A.**

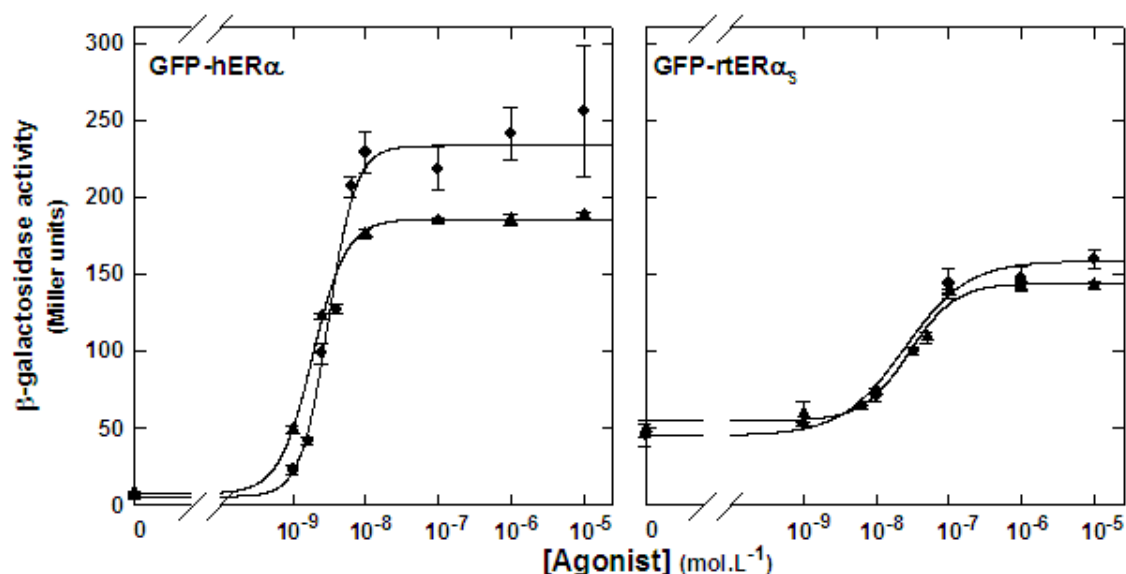
	hERα		rtERα_S	
	E2	DES	E2	DES
EC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	2.3±0.4	3.0±0.3	22.8±6.0	29.8±8.3
Ligand induction Factor	25.8	22.2	2.0	1.7

B.

	hERα		rtERα_S	
	E2	DES	E2	DES
EC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	3.2±0.1	1.9±0.3	33.0±6.2	37.8±8.1
Ligand induction Factor	47.7	37.9	3.2	2.9

The EC₅₀ value was extracted from the dose-response curves. The ligand induction factor was calculated by dividing the maximal β -galactosidase activity in the presence of ligand by the β -galactosidase activity in the absence of ligand. These data are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate.

A.



B.

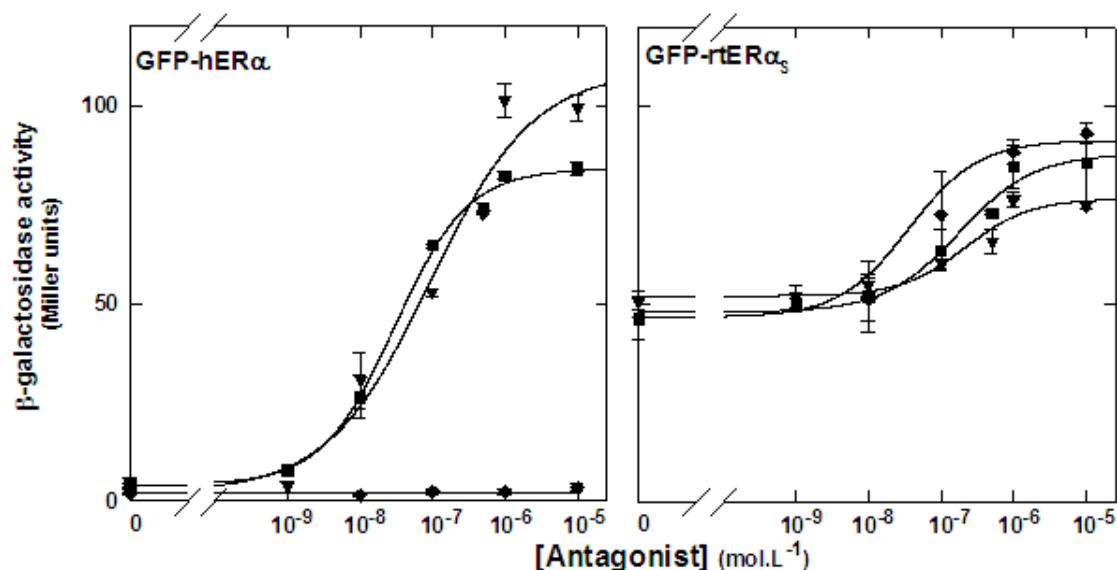


Figure 4: Agonist effect of ligands on functional properties of GFP-hER α and GFP-rtER α_s . Yeast cells co-transformed with either pY60gfphera α or pY60gfprtera α_s expression vectors and the β -galactosidase reporter vector YRPE2. Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose and treated with different ligand concentrations (●, E2; ▲, DES; ■, 4-OHT; ▼, RAL; ◆, ICI). β -galactosidase activity was measured after 16h hormonal stimulation. Results are expressed as dose-response curves, each value representing the mean of at least three independent experiments.

Table 2: Transcriptional activity of ERs and GPERs in presence of various antiestrogens.**A.**

	hERα			rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
EC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	28.9±1.9	75.3±6.3	n.d.	135.8±15.2	170.3±14.7	75.8±7.8
Ligand induction Factor	11.5	9.2	n.d.	1.3	1.0	1.6

B.

	GFP-hERα			GFP-rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
EC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	29.5±6.1	82.9±6.3	n.d.	175.1±6.4	119.8±12.2	85.0±12.6
Ligand induction Factor	17.1	21.9	n.d.	1.5	1.8	1.8

The EC₅₀ value was extracted from the dose-response curves. The ligand induction factor was calculated by dividing the maximal β -galactosidase activity in the presence of ligand by the β -galactosidase activity in the absence of ligand. These data are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate.

ICI is a partial antagonist of rtER α s

To examine the antagonist effect of 4-OHT, RAL and ICI, we measured the cellular activity of each receptor in the presence of a fixed concentration (10^{-7} M) of pure agonist (E2 or DES) and increasing concentrations of the various antagonists (Figure 5 and Table 3). Our data show that ICI is a partial antagonist of rtER α s and a pure antagonist for hER α . Moreover, for both ERs, ICI is the less efficient antagonist (lower ligand repression factor), whereas 4-OHT and RAL exert a similar effect. Unlike hER α , ICI is the less affine antagonist tested of rtER α s (higher EC₅₀). We finally notice that the effect of both antagonists is similar for ERs and GFP-ERs.

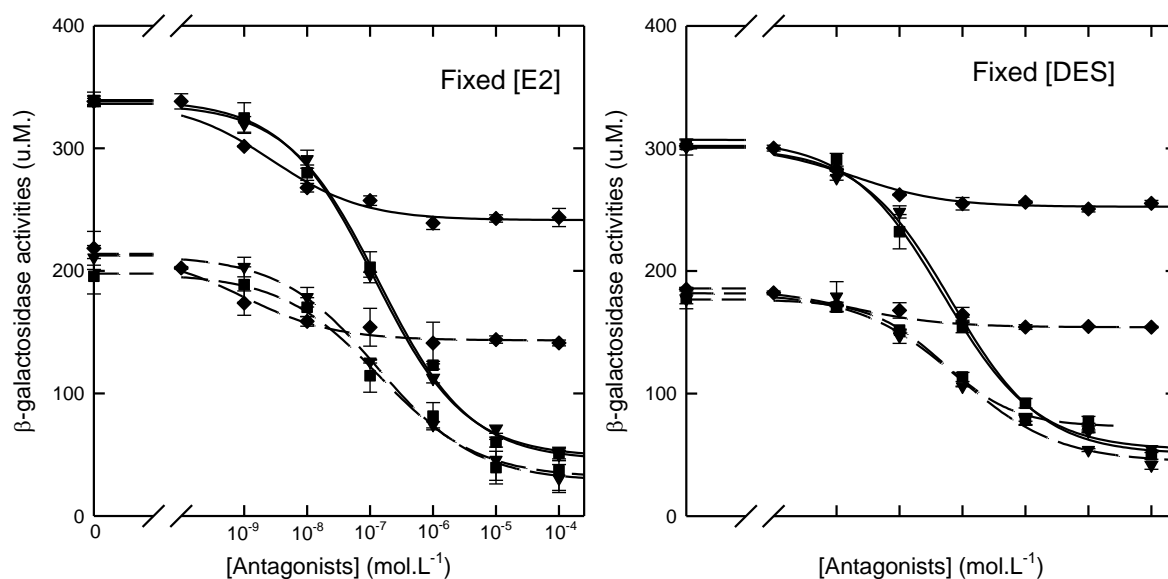
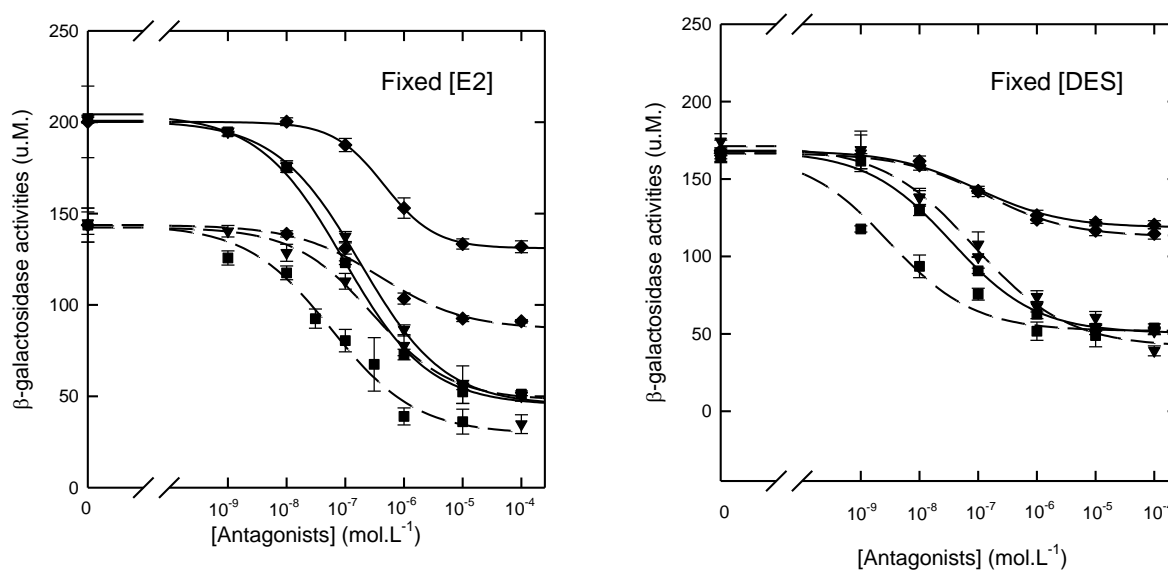
A. hER α **B. rtER α_s** 

Figure 5: Antagonist effect of antiestrogenic ligands on functional properties of ERs (—) and GFP-ERs (---). Yeast cells co-transformed with either pY60(gfp)hera or pY60(gfp)rter α_s expression vector and the β -galactosidase reporter vector YRPE2. Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose and treated with different ligand concentrations (●, E2; ▲, DES; ■, 4-OHT; ▼, RAL; ◆, ICI). β -galactosidase activity was measured after 16h hormonal stimulation. Results are expressed as dose-response curves, each value representing the mean of at least three independent experiments.

Table 3: Antagonist effect of antiestrogens on transcriptional activity of ERs and GPERs in the presence of E2 (A and B) or DES (C and D).

A.	hERα			rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
IC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	138.6±18.5	117.2±12.1	1.3±0.3	94.1±1.8	180.0±15.4	662.4±28.3
Ligand repression Factor	6.9	6.6	1.4	4.3	4.3	1.5
B.	GFP-hERα			GFP-rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
IC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	132.7±26.5	130.3±17.8	1.0±0.1	113.2±3.2	229.3±29.4	400.4±18.5
Ligand repression Factor	6.2	6.7	1.4	4.7	3.0	1.6
C.	hERα			rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
IC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	49.5±11.0	66.4±7.5	1.9±0.2	35.4±0.6	27.1±2.1	98.0±3.0
Ligand repression Factor	5.4	5.8	1.2	4.3	4.3	1.5
D.	GFP-hERα			GFP-rtERα_s		
	4-OHT	RAL	ICI	4-OHT	RAL	ICI
IC₅₀ (10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹)	52.0±8.7	69.9±8.8	1.7±0.1	24.5±3.8	26.5±6.9	74.0±2.1
Ligand repression Factor	3.7	5.8	1.2	3.2	4.0	1.5

The IC₅₀ value was extracted from the dose-response curves displayed in Figure 5. The ligand repression factor was calculated by dividing the maximal β -galactosidase activity in the absence of antiestrogen by the β -galactosidase activity in the presence of antiestrogen. These data are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate.

Distinct sub-cellular distribution of GFP-hER α and GFP-rtER α_S

After having demonstrated that GFP-ERs fusion proteins exhibited the same functional properties that ERs, sub-cellular localization experiments have been undertaken. Control experiments carried out with transfected *S. cerevisiae* with GFP-expressing plasmid show that GFP localization was not affected by ligand presence (data not shown). Figure 6A displays the sub-cellular distribution of GFP-hER α and GFP-rtER α_S in presence or not of E2. In absence of ligand, GFP-hER α mainly resides in the nuclear compartment, whereas GFP-rtER α_S is diffuse in the whole yeast cell. In the presence of ligands, the uniform nuclear distribution of GFP-hER α is changed towards a nuclear punctate pattern where GFP-hER α is found within many distinct foci of different sizes. For GFP-rtER α_S , intense cytoplasmic foci appear upon hormonal treatment. Whatever the ligand used, we also observed nuclear foci for GFP-hER α and cytoplasmic foci for GFP-rtER α_S (data not shown). Additionally, these foci do not correspond to degraded GFP-ERs as shown by western blot revelation of the proteins after electrophoresis of the yeast extracts (Figure 6B). Indeed, whatever the ligand and GFP-ER are, no additional band with a lower apparent molecular weight is detected by Western blot analysis. Interestingly, we notice that the GFP-rtER α_S resolves into two bands in the presence of ligands, whereas GFP-hER α keeps on migrating as a unique band. This result may reflect post- translational modifications for the sole GFP-rtER α_S . These data interestingly suggest that hormonal stimulation induces a dynamic spatial reorganization of both GFP-ERs with probable post-translational changes for GFP-rtER α_S .

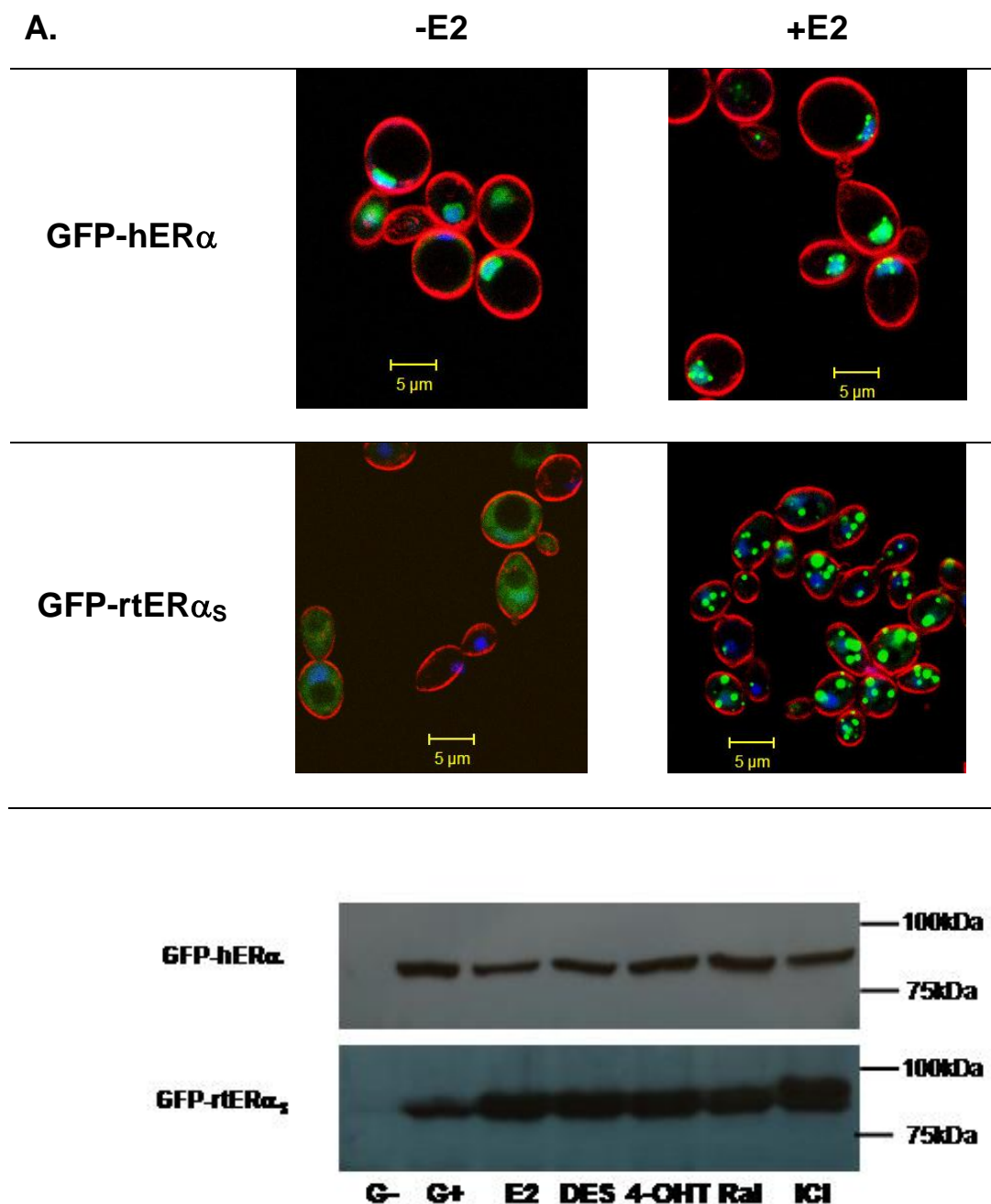


Figure 6: Effect of E2 treatment on sub-cellular localization of GFP-hER α and GFP-rtER α_S in *Saccharomyces cerevisiae*. Cells were transformed with pY60gfphera α or pY60gfprtera α_S . Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose and treated or not with 10^{-7} M E2 (or other ligands).

A. Localization subcellular of GFP-ERs in *Saccharomyces cerevisiae*. Two fluorescent probes were used for visualizing the nucleus (blue) and the cell membrane (red), DRAQ-5 and FPMM4-64, respectively.

B. Western blot. The amount of total proteins, in each lane, was the same, 90 μ g.

Ligand-mediated sub-cellular redistribution of ERs faster occurs than activation of gene expression

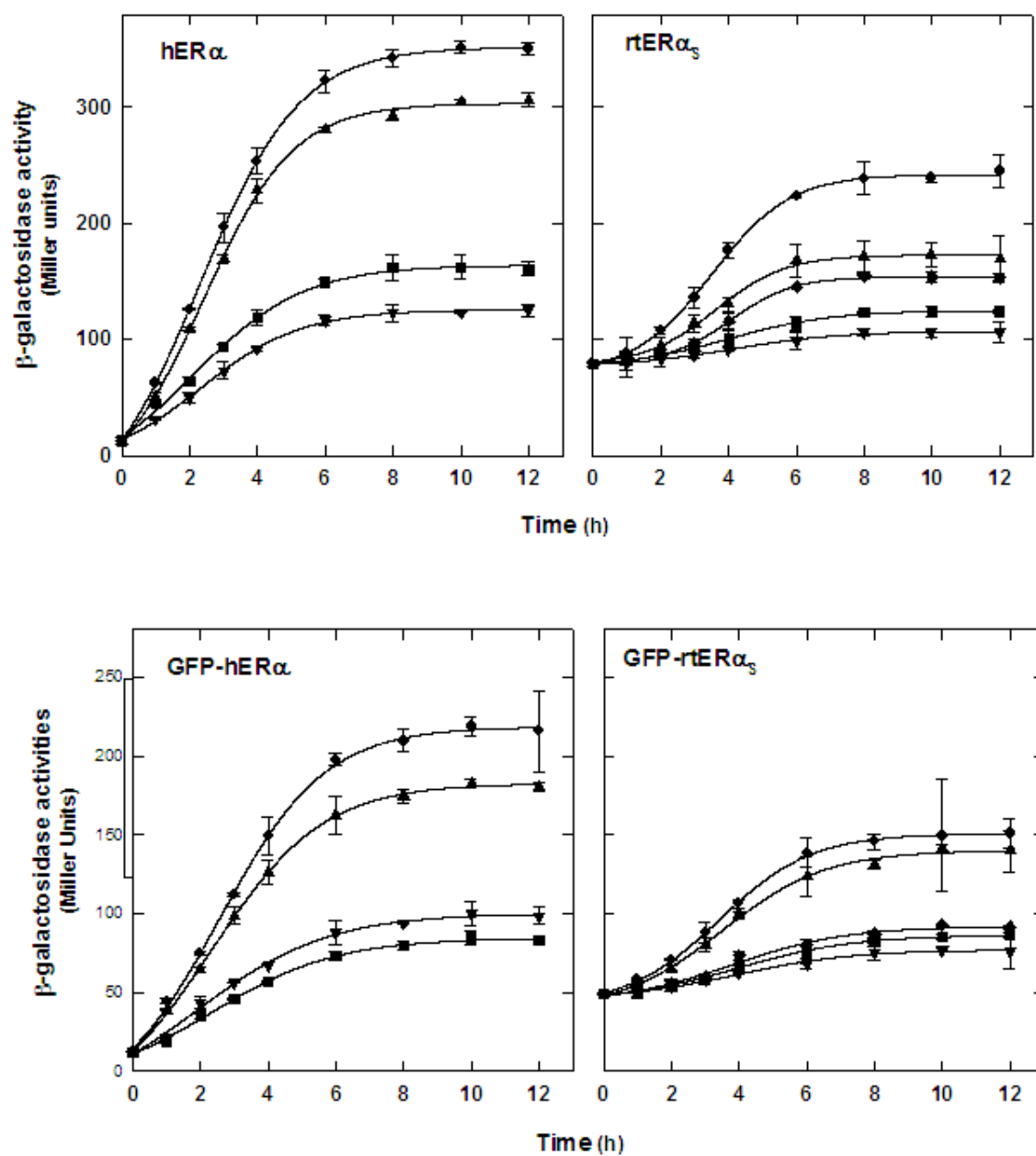
We focused on the kinetics of the ligand-stimulated ER transactivation. To this end, we measured the cellular activity of ERs following ligand treatment applied 12 hours after ER induction in the transfected yeasts (Figure 7A). The half-lives ($t_{1/2}$) values, extracted from these time courses, are displayed in Table 4. The kinetics of ligand-dependent transactivation of hER α ($t_{1/2} \sim 2\text{h}$) is faster than for rtER α_S ($t_{1/2} \sim 3.5\text{h}$). These observations might result from one higher hER α -induced stabilization of mRNA compared to that observed with rtER α_S . Similar result was observed with GFP-ERs fusion proteins.

Besides, we monitored the kinetics of the sub-cellular re-distribution of both ERs upon hormonal stimulation (Figure 7B). Whatever the ER, this sub-cellular re-distribution occurs within 10 min after hormonal stimulation.

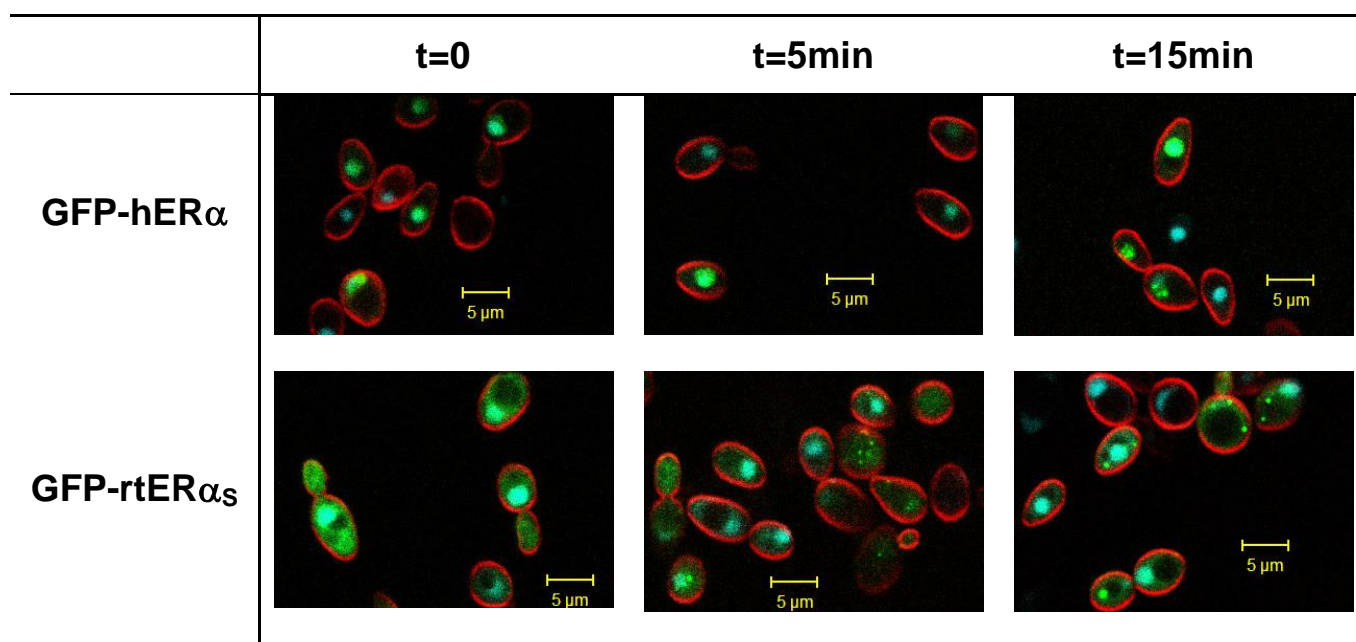
These results might indicate that both hormonal-mediated processes are independent.

It was further verified that no ERs degradation occurred during this hormonal stimulation time (Figure 7C).

A.



B.



C.

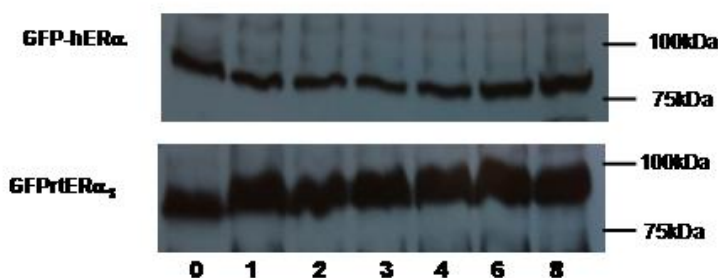


Figure 7: Time-course of transcriptional activity of ERs stimulated by estrogens and antiestrogens (A) and sub-cellular distribution of GFP-ERs stimulated by E2 (B).

Cells were transformed with pY60ers or pY60gfprs. Recombinant cells were grown in YPRE medium until $OD_{600nm, l=1cm} = 0.6$ and ER expression was induced with 2% of galactose. 16 h after induction, cells were treated with different ligand concentrations (●, E2; ▲, DES; ■, 4-OHT; ▼, RAL; ◆, ICI).

A. β -galactosidase activity was measured at different times after hormonal stimulation. Values represented a mean of at least three independent experiments.

B. Localization subcellular of GFP-ERs in *Saccharomyces cerevisiae* at different times after E2 stimulation. Two fluorescent probes were used for visualizing the nucleus (blue) and the cell membrane (red), DRAQ-5 and FPM4-64, respectively.

C. Western blot analysis of ER amount at different times after E2 stimulation. The amount of total proteins, in each lane, was the same, 90 μ g.

Table 4: Time-course of transcriptional activity of ERs stimulated by estrogens and antiestrogens.

		E2	DES	4-OHT	RAL	ICI
t_{1/2} (h)	GFP-hERα	2.6 \pm 0.2	2.3 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2	n.d.
	hERα	2.3 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.1	n.d.
	GFP-rtERα_S	3.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.1	4.0 \pm 0.2	3.9 \pm 0.1	3.8 \pm 0.3
	rtERα_S	3.5 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	4.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2

The t_{1/2} value was extracted from the displayed curve of β -galactosidase activity measured at different times after hormonal stimulation in Figure 7.

The t_{1/2} value was calculated by dividing the maximal β -galactosidase activity in the absence of antiestrogen by the β -galactosidase activity in the presence of antiestrogen. These data are the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate.

Discussion

Information on genes expression and their regulation is central to the understanding of biological processes which require a good knowledge of the cellular signalling and metabolic pathways. These complex cellular events imply multiple biological networks settings and dynamic interactions between these networks.

Estrogens play a pivotal role in the control of gene expression through ligand-activated transcriptional factors commonly called estrogen receptors (ERs). Indeed, following estrogen stimulation, a sequence of events occur such as estrogen binding to membrane receptors, activation of complex enzymatic system (as kinase cascades), dissociation of estrogen receptor from transient complexes, import of active ER in the nucleus, its binding to estrogen-responsive genes and induction of mRNA expression. All these events are finely controlled. In the current study, we present a comparison of the effect of various ligands on the cellular activity and localization of two estrogen receptors, hER α and rtER α_S , structurally and biologically distinct, expressed within a same cellular expression system, namely *Saccharomyces cerevisiae*. This expression system was already used for at least two reasons: (i) no expression of endogenous ER and (ii) conserved activity of exogenously expressed hER α and rtER α_S (44, 49). Indeed, it has been already reported that hER α and rtER α_S expressed in yeast maintain a high specificity and affinity for estradiol and are able to enhance transcription from yeast promoters linked to consensus estrogen-responsive elements (ERE). The ligands used here are E2 (natural steroidal agonist), DES (synthetic estrogen), 4-OHT (steroidal partial agonist), RAL (nonsteroidal partial agonist) and ICI-182,780 (steroidal pure antagonist).

Here we show that (i) hER α activates gene transcription in the presence of ligand whereas activation by rtER α_S can also occur in the absence of ligand; (ii) rtER α_S is a less

efficient transcription factor than hER α . DES is an efficient and potent agonist of hER α and rtER α_S as E2. 4-OHT and RAL are partial antagonists for both receptors, whereas ICI 182-780 is a pure antagonist for hER α and a partial antagonist for rtER α_S . Our study further shows that 4-OHT and RAL are efficient antiestrogens for hER α and rtER α_S . All these results show that hER α and rtER α_S differentially regulate estrogen responsive genes. These distinct functional properties of ERs might come from distinct sub-cellular distribution since ER subcellular localization depends not only on the NLS sequences but also on the nature and composition of the large macromolecular complexes formed with ER (52, 57). Indeed, hER α resides mainly within the nucleus of many cellular systems (58-62), whereas hER β is mainly located within mitochondria of human cells as well as other cell types (63-64). Both hER subtypes thus exhibit different structural and biological properties.

Human ER α protein contains four nuclear localization signal (NLS) sequences, three constitutive in the DBD and the hinge domain located between the DBD and LBD domains and one estrogen-inducible. All four NLSs cooperate in nuclear ER localization (65). Additionally, hER α contains one nuclear export signal sequence (NES) found in the LBD (66). By computer assisted analysis, only two putative NLS homolog of those found in hER α would be conserved in rtER α_S , while the NES sequence found in the LBD of hER α is maintained in rtER α_S .

To test the hypothesis that ERs subcellular localization regulates gene expression, we have expressed GFP-ERs in yeast and have first confirmed that GFP-ERs respond to both agonist and antagonist ligands as untagged ERs do even if GFP-ERs appeared to be less active than ERs. GFP-hER α exhibits a ligand-dependent transcriptional activity as hER α , whereas GFP-rtER α_S exhibits ligand-dependent and independent transcriptional activities as rtER α_S . ICI is a partial agonist for GFP-rtER α_S , whereas it is a pure antagonist for GFP-

hER α . Our study shows that rtER α_S exhibits not only distinct cellular activities but also a distinct sub-cellular localization. Indeed, in the absence of hormone, GFP-hER α is mainly and uniformly distributed in the nucleus compartment, whereas GFP-rtER α_S is uniformly distributed in the whole yeast cell. In the presence of hormone, whatever the ligand used here, the initial diffuse nuclear localization of GFP-hER α evolves towards the formation of nuclear foci upon ligand addition, whereas the diffuse presence of GFP-rtER α_S in the whole cell changes towards the formation of cytoplasmic foci. The formation of these focal structures is an extremely rapid process since they appear as soon as 5 min after the hormonal stimulation while increasing with time. Though the formation of these foci, in which ERs are trapped, requires the ligand presence, the corresponding functional role of these foci remains unknown. However, it may be assessed that these focal structures are not related to proteasomes and do not control the interaction of ER with its specific DNA targets. Indeed, the large time scales differences between the ligand-induced foci formation (few min) and ligand-stimulated transcriptional activation of ER (few hours) strongly suggest that they constitute two independent processes. Since it has been shown that E2, 4-OHT and ICI enhance overall ER phosphorylation (67), we propose that these foci trap phosphorylated ER. However, further studies are necessary to determine the molecular structure and role of estrogen ligands-induced cytoplasmic and nuclear foci.

Thus, our study shows that hER α and rtER α_S are involved in different and distinct cellular signalling pathways.

In conclusion, the expression of GFP-ERs in yeast allowed us to measure straightforwardly the localization and re-distribution of ERs upon hormonal stimulation. It clearly arises that such comparative studies, performed with distinct structural and functional estrogen receptors but in a unique cellular environment, are essential for a better knowledge of the cellular signalling pathways involved in gene expression by ER.

Bibliographie

1. Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and Chambon, P. (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA, *Journal of Steroid Biochemistry* 24, 77-83.
2. Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA, *Science* 231, 1150-1154.
3. Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J. (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5925-5930.
4. Menuet, A., Anglade, I., Flouriot, G., Pakdel, F., and Kah, O. (2001) Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout, *Biology of Reproduction* 65, 1548-1557.
5. Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *FEBS letters* 392, 49-53.
6. Pakdel, F., Metivier, R., Flouriot, G., and Valotaire, Y. (2000) Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene, *Endocrinology* 141, 571-580.
7. Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta, *Molecular Endocrinology* 11, 353-365.
8. Claret, F. X., Chapel, S., Garces, J., Tsai-Pflugfelder, M., Bertholet, C., Shapiro, D. J., Wittek, R., and Wahli, W. (1994) Two functional forms of the *Xenopus laevis* estrogen receptor translated from a single mRNA species, *J Biol Chem* 269, 14047-14055.
9. Griffin, C., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Nestor, P., and Gannon, F. (1998) Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage, *Endocrinology* 139, 4614-4625.

10. Patino, R., Xia, Z., Gale, W. L., Wu, C., Maule, A. G., and Chang, X. (2000) Novel transcripts of the estrogen receptor alpha gene in channel catfish, *Gen Comp Endocrinol* 120, 314-325.
11. Campbell-Thompson, M., Lynch, I. J., and Bhardwaj, B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer, *Cancer Res* 61, 632-640.
12. Campbell-Thompson, M., Reyher, K. K., and Wilkinson, L. B. (2001) Immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in gastric epithelium and enteric neurons, *J Endocrinol* 171, 65-73.
13. McInerney, E. M., Weis, K. E., Sun, J., Mosselman, S., and Katzenellenbogen, B. S. (1998) Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras, *Endocrinology* 139, 4513-4522.
14. Valimaa, H., Savolainen, S., Soukka, T., Silvoniemi, P., Makela, S., Kujari, H., Gustafsson, J. A., and Laine, M. (2004) Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands, *J Endocrinol* 180, 55-62.
15. Dietrich, W., Haitel, A., Holzer, G., Huber, J. C., Kolbus, A., and Tschugguel, W. (2006) Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in normal human synovia, *J Soc Gynecol Investig* 13, 512-517.
16. Cavallini, A., Messa, C., Pricci, M., Caruso, M. L., Barone, M., and Di Leo, A. (2002) Distribution of estrogen receptor subtypes, expression of their variant forms, and clinicopathological characteristics of human colorectal cancer, *Dig Dis Sci* 47, 2720-2728.
17. Wihlen, B., Ahmed, S., Inzunza, J., and Matthews, J. (2009) Estrogen receptor subtype- and promoter-specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription, *Mol Cancer Res* 7, 977-986.
18. Titolo, D., Cai, F., and Belsham, D. D. (2006) Coordinate regulation of neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression by estrogen depends on the ratio of estrogen receptor (ER) alpha to ERbeta in clonal hypothalamic neurons, *Mol Endocrinol* 20, 2080-2092.
19. Friend, K. E., Ang, L. W., and Shupnik, M. A. (1995) Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4367-4371.

20. Chu, S., and Fuller, P. J. (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene, *Mol Cell Endocrinol* 132, 195-199.
21. Boyce-Derricott, J., Nagler, J. J., and Cloud, J. G. (2009) The ontogeny of nuclear estrogen receptor isoform expression and the effect of 17beta-estradiol in embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Mol Cell Endocrinol*.
22. Nagler, J. J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D. G., and Rexroad, C., 3rd. (2007) The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ERalpha2 and both ERbeta isoforms, *Gene* 392, 164-173.
23. Ascenzi, P., Bocedi, A., and Marino, M. (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor [alpha] and [beta]: Impact on human health, *Molecular Aspects of Medicine* 27, 299-402.
24. Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., and Gustafsson, J. A. (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors, *Pharmacological reviews* 58, 773-781.
25. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001) Mechanisms of estrogen action, *Physiological reviews* 81, 1535-1565.
26. Pakdel, F., Le Gac, F., Le Goff, P., and Valotaire, Y. (1990) Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA, *Molecular and Cellular Endocrinology* 71, 195-204.
27. Pakdel, F., Le Guellec, C., Vaillant, C., Le Roux, M. G., and Valotaire, Y. (1989) Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs, *Mol Endocrinol* 3, 44-51.
28. Deblois, G., and Giguere, V. (2003) Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation, *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 123-131.
29. Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev* 14, 121-141.
30. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors, *Nature* 387, 733-736.

31. McKenna, N. J., and O'Malley, B. W. (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators--an update, *Endocrinology* 143, 2461-2465.
32. McKenna, N. J., and O'Malley, B. W. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators, *Cell* 108, 465-474.
33. Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors, *EMBO J* 15, 3667-3675.
34. Bommer, M., Benecke, A., Gronemeyer, H., and Rochette-Egly, C. (2002) TIF2 mediates the synergy between RARalpha 1 activation functions AF-1 and AF-2, *J Biol Chem* 277, 37961-37966.
35. Ylikomi, T., Wurtz, J. M., Syvala, H., Passinen, S., Pekki, A., Haverinen, M., Blauer, M., Tuohimaa, P., and Gronemeyer, H. (1998) Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 437-466.
36. Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R. M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase, *Cell* 98, 675-686.
37. Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription, *Cell* 103, 843-852.
38. Klinge, C. M. (1999) Estrogen receptor binding to estrogen response elements slows ligand dissociation and synergistically activates reporter gene expression, *Molecular and Cellular Biology* 19, 99-111.
39. McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology, *Endocr Rev* 20, 321-344.
40. Dutertre, M., and Smith, C. L. (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains, *Molecular Endocrinology* 17, 1296-1314.
41. Jaber, B. M., Gao, T., Huang, L., Karmakar, S., and Smith, C. L. (2006) The pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 promotes a novel interaction of estrogen receptor-alpha with the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein-binding protein/p300 coactivators, *Molecular Endocrinology* 20, 2695-2710.

42. Robyr, D., Wolffe, A. P., and Wahli, W. (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks, *Mol Endocrinol* 14, 329-347.
43. Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 140-147.
44. Petit, F., Valotaire, Y., and Pakdel, F. (1995) Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *European Journal of Biochemistry* 233, 584-592.
45. Bouter, A., Le Tilly, V., and Sire, O. (2005) Interplay of flexibility and stability in the control of estrogen receptor activity, *Biochemistry* 44, 790-798.
46. McDonnell, D. P., Nawaz, Z., Densmore, C., Weigel, N. L., Pham, T. A., Clark, J. H., and O'Malley, B. W. (1991) High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 291-297.
47. Pakdel, F., Petit, F., Anglade, I., Kah, O., Delaunay, F., Bailhache, T., and Valotaire, Y. (1994) Overexpression of rainbow trout estrogen receptor domains in *Escherichia coli*: characterization and utilization in the production of antibodies for immunoblotting and immunocytochemistry, *Mol Cell Endocrinol* 104, 81-93.
48. Lagree, V., Pellerin, I., Hubert, J. F., Tacnet, F., Le Caherec, F., Roudier, N., Thomas, D., Gouranton, J., and Deschamps, S. (1998) A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in *Xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes, *J Biol Chem* 273, 12422-12426.
49. Bouter, A., Buisine, N., Le Grand, A., Mouchel, N., Le Tilly, V., Wolff, J., and Sire, O. Control of vitellogenin genes expression by sequences derived from transposable elements in rainbow trout, *submitted for publication in Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*
50. Bouma, J., and Nagler, J. J. (2001) Estrogen receptor- α protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle, *Biol Reprod* 65, 60-65.
51. Bouter, A. (2003) Régulation du promoteur du gene vitellogénine chez la truite arc-en-ciel : Etude moléculaire et fonctionnelle de l'interaction entre le récepteur aux œstrogènes et des Eléments de Réponse aux œstrogènes, *Thèse de docteur de l'Université de Bretagne-Sud.*
52. Metivier, R., Huet, G., Gallais, R., Finot, L., Petit, F., Tiffocche, C., Merot, Y., LePeron, C., Reid, G., Penot, G., Demay, F., Gannon, F., Flouriot, G., and Salbert, G.

- (2008) Dynamics of estrogen receptor-mediated transcriptional activation of responsive genes in vivo: apprehending transcription in four dimensions, *Adv Exp Med Biol* 617, 129-138.
53. Le Drean, Y., Kern, L., Pakdel, F., and Valotaire, Y. (1995) Rainbow trout estrogen receptor presents an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor, *Molecular and Cellular Endocrinology* 109, 27-35.
54. Matthews, J. B., Clemons, J. H., and Zacharewski, T. R. (2001) Reciprocal mutagenesis between human alpha (L349, M528) and rainbow trout (M317, I496) estrogen receptor residues demonstrates their importance in ligand binding and gene expression at different temperatures, *Molecular and Cellular Endocrinology* 183, 127-139.
55. Sumida, K., Ooe, N., Saito, K., and Kaneko, H. (2003) Limited species differences in estrogen receptor alpha-mediated reporter gene transactivation by xenoestrogens, *J Steroid Biochem Mol Biol* 84, 33-40.
56. Zhu, B. T., Han, G. Z., Shim, J. Y., Wen, Y., and Jiang, X. R. (2006) Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding, *Endocrinology* 147, 4132-4150.
57. Hager, G. L., Lim, C. S., Elbi, C., and Baumann, C. T. (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 249-254.
58. Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., and Hager, G. L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor, *Molecular biology of the cell* 10, 471-486.
59. Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., and Yamamoto, K. R. (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors, *Cell Regulation* 1, 291-299.
60. Stenoien, D. L., Mancini, M. G., Patel, K., Allegretto, E. A., Smith, C. L., and Mancini, M. A. (2000) Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1, *Mol Endocrinol* 14, 518-534.
61. Stenoien, D. L., Patel, K., Mancini, M. G., Dutertre, M., Smith, C. L., O'Malley, B. W., and Mancini, M. A. (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent, *Nature cell biology* 3, 15-23.

62. Gasc, J. M., and Baulieu, E. E. (1986) Steroid hormone receptors: intracellular distribution, *Biol Cell* 56, 1-6.
63. Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., and Yager, J. D. (2004) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1011-1022.
64. Monje, P., and Boland, R. (2001) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary, *J Cell Biochem* 82, 467-479.
65. Ylikomi, T., Bocquel, M. T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors, *EMBO Journal* 11, 3681-3694.
66. Saporita, A. J., Zhang, Q., Navai, N., Dincer, Z., Hahn, J., Cai, X., and Wang, Z. (2003) Identification and Characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor, *The Journal of Biological Chemistry* 278, 41998-42005.
67. Le Goff, P., Montano, M. M., Schodin, D. J., and Katzenellenbogen, B. S. (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity, *Journal of Biological Chemistry* 269, 4458-4466.

III.2 Résultats non montrés de l'article 3

Les tableaux 11, 12 et 13 présentent la localisation subcellulaire de hER α et rtER γ fusionnés à la GFP en fonction des ligands suivie par microscopie confocale de fluorescence. Quelque soit le ligand ou la combinaison de ligands (agoniste + antagoniste partiel) testé, les deux récepteurs aux œstrogènes subissent une relocalisation avec la formation de *foci* : relocalisation nucléaire pour hER α et cytoplasmique pour rtER γ . Cette relocalisation est indépendante de la nature du ligand. D'autre part, les clichés de levures exprimant la GFP seule montrent que sa localisation n'est pas affectée par la présence des ligands.

Le Tableau 14 montre des clichés de levures sauvages et de levures transformées par un plasmide pY60AQPcic exprimant une aquaporine. Aucune auto-fluorescence des cellules n'est observée.

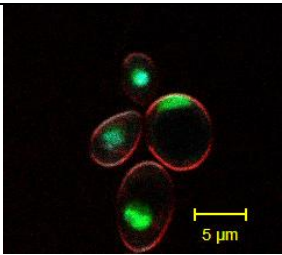
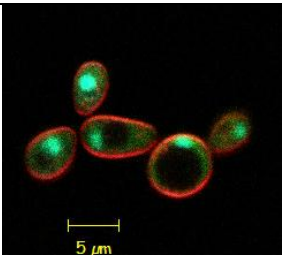
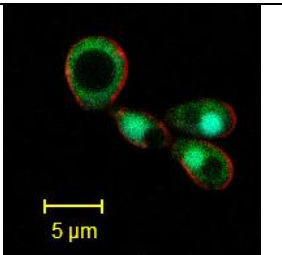
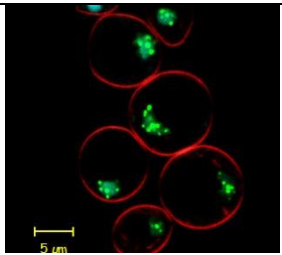
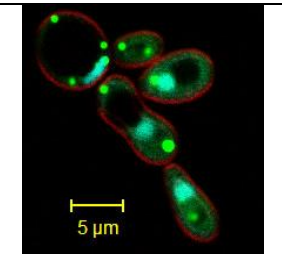
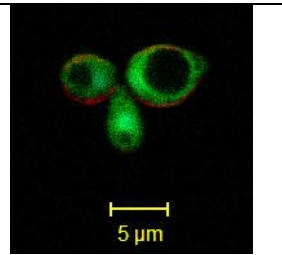
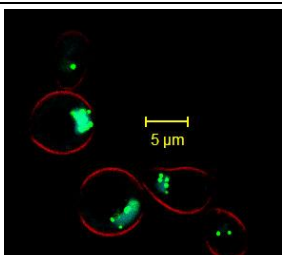
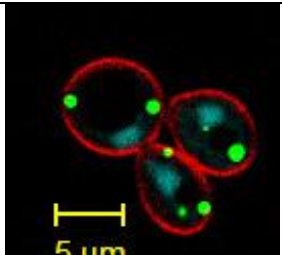
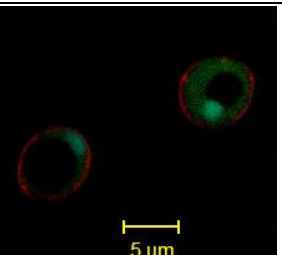
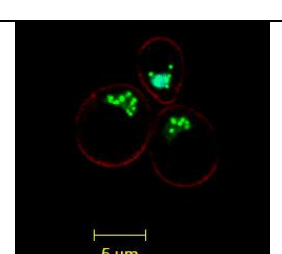
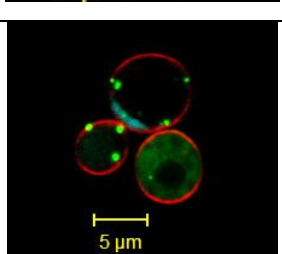
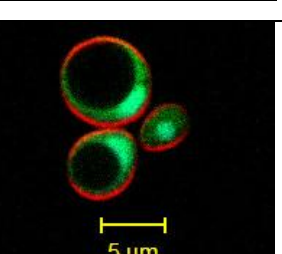
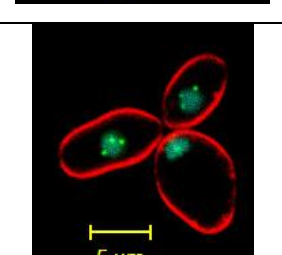
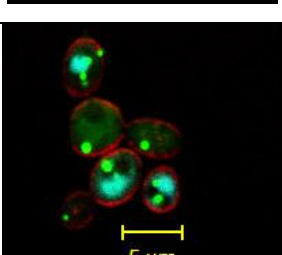
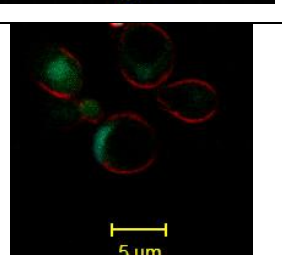
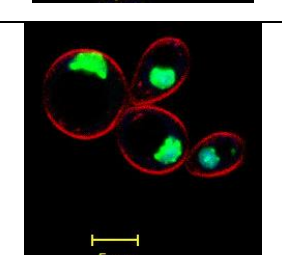
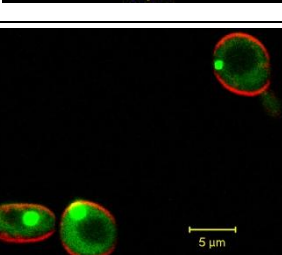
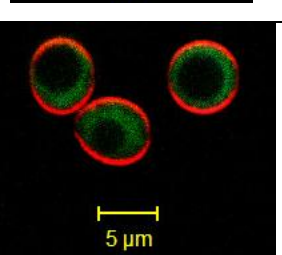
	GFP α	GFP α	GFP
\emptyset			
+ E2 (10 ⁻⁷ M)			
+ DES (10 ⁻⁷ M)			
+ 4-OHT (10 ⁻⁵ M)			
+ Ral (10 ⁻⁴ M)			
+ ICI (10 ⁻⁶ M)			

Tableau 11 : Localisation subcellulaire de GFP α , GFP α et GFP en fonction des ligands : en absence, en présence d'agoniste (E2 ou DES) ou d'antagoniste (4-OHT, Ral ou ICI).

En vert = GFP ; en rouge = FPMM4-64 (enveloppe) ; en bleu = DRAQ5 (noyau)

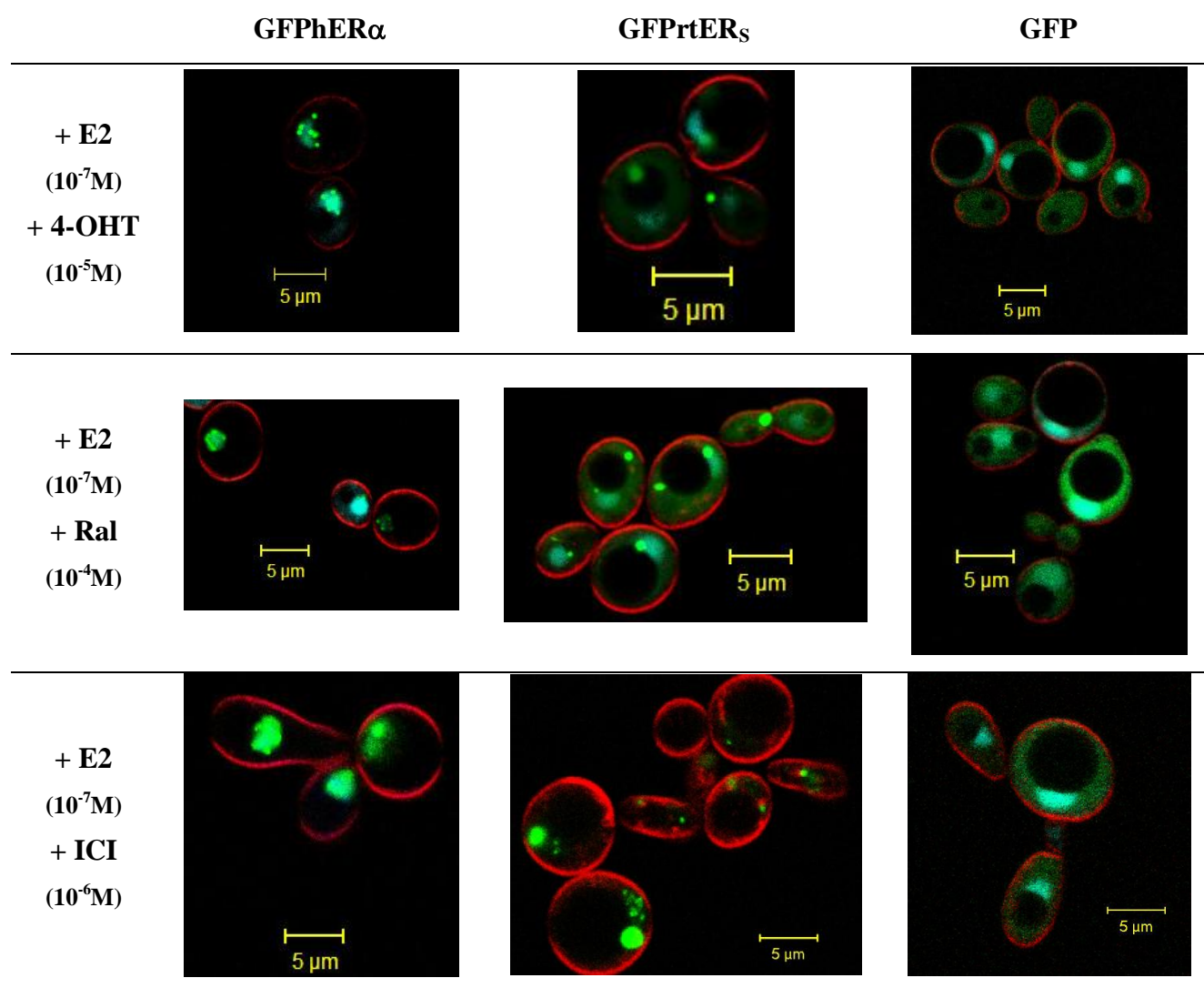


Tableau 12 : Localisation subcellulaire de GFP $\text{hER}\alpha$, GFP rtER_s et GFP en présence de E2 et d'antagonistes (4-OHT, Ral, ICI).

En vert = GFP ; en rouge = FPMM4-64 (enveloppe) ; en bleu = DRAQ5 (noyau)

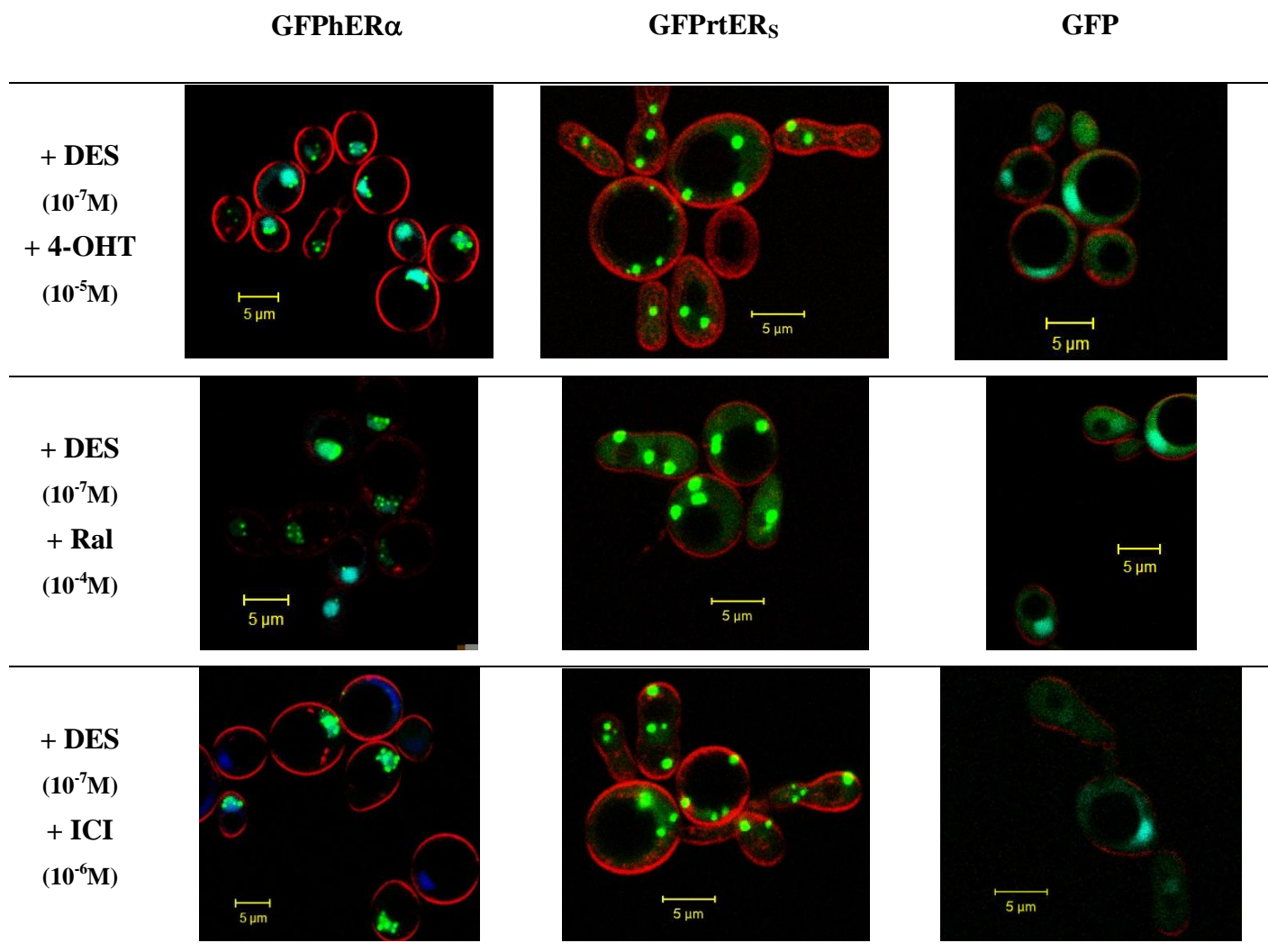


Tableau 13 : Localisation subcellulaire de GFP_{HERα}, GFP_{PrER_s} fusionnés à la GFP en présence de DES et d'antagonistes.

En vert = GFP ; en rouge = FPMM4-64 (enveloppe) ; en bleu = DRAQ5 (noyau)

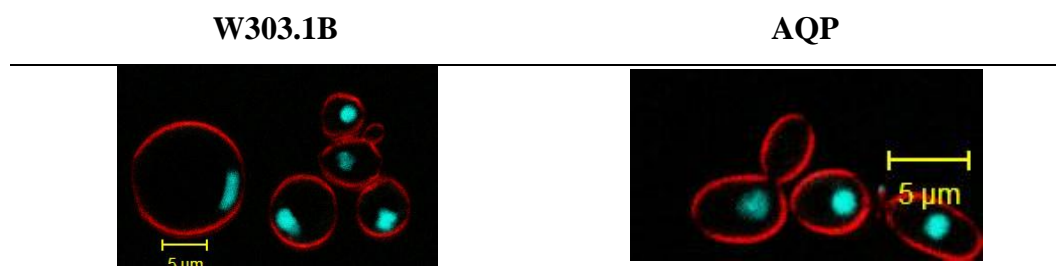


Tableau 14 : Absence d'autofluorescence des levures sauvages (souches W303.1B) et de cellules exprimant l'aquaporine.

En rouge = FPMM4-64 (enveloppe) ; en bleu = DRAQ5 (noyau)

IV. Chapitre 4 : Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire et la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes

IV.1 Introduction du chapitre 4

Il est connu que l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes est modulée par des coactivateurs (Bourguet *et al.*, 2000; Ascenzi *et al.*, 2006) et son état de phosphorylation (Ascenzi *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006). Les différents sites de phosphorylation de l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain ont été identifiés par délétions et mutations : 4 résidus sérine sont présents dans le domaine A/B, 1 résidu sérine dans le domaine C, 1 résidu sérine et 1 résidu thréonine dans le domaine D et 1 résidu tyrosine dans le domaine E/F (Figure 17). Il a été montré que l'état de phosphorylation de ces résidus joue un rôle sur la liaison à l'ADN (Castano *et al.*, 1997; Castano *et al.*, 1998; Joel *et al.*, 1998a; Murphy *et al.*, 2006; Tharakan *et al.*, 2008), le recrutement de coactivateurs (White *et al.*, 1997; Endoh *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000a; Dutertre et Smith, 2003) et/ou la localisation subcellulaire du récepteur (Lee et Bai, 2002). La littérature décrit pour chacun de ces résidus une ou plusieurs protéines kinases responsables de leur phosphorylation (Tableau 7). Une partie de ces kinases appartient à l'une de deux grandes familles de kinases à savoir les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) ou les CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*).

Afin de mesurer l'activité cellulaire et de suivre la localisation subcellulaire des récepteurs aux œstrogènes, nous avons choisi, tout au long de notre étude, de les exprimer chez la levure *S. cerevisiae*. Les deux grandes familles de kinases MAPKs et CDKs sont conservées chez les eucaryotes. Ainsi chez *S. cerevisiae*, cinq MAPKs (Fus3, Kss1, Slt2, Hog1 et Smk1) jouent un rôle dans cinq cascades de phosphorylation différentes. Fus3, Kss1 et Slt2 sont homologues aux kinases humaines ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*) alors que Hog1 est équivalent à la p38MAPK chez l'homme. Seule Smk1 ne possède pas d'homologue connu chez l'humain. Chez *S. cerevisiae*, cinq CDKs sont retrouvées dont Cdc28 (homologue aux kinases humaines Cdk1/2), Kin28 (homologue à Cdk7) et Pho85 (homologue à Cdk5). La cycline associée à Kin28 est Ccl1. Cdc28 peut interagir avec 9 cyclines (Cln1, 2, 3 et Clb1, 2, 3, 4, 5, 6) contre 10 pour Pho85 (Pho80, Pcl1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et Clg1).

Tous les sites de phosphorylation de hER β n'ont pas été identifiés. Tremblay et collaborateurs rapportent que la phosphorylation des résidus S87 et S105 augmente l'interaction de hER β avec des coactivateurs (Tremblay *et al.*, 1999). Un alignement de séquences avec hER α suggère que 3 autres résidus sérine et un résidu tyrosine sont susceptibles d'être phosphorylés (Ascenzi *et al.*, 2006). La phosphorylation du rtER γ n'a jamais été étudiée ; une comparaison de séquences avec hER α montre que 4 résidus sérine et un résidu tyrosine pourraient être la cible de phosphorylation (Figure 29). Le résidu T311 de hER α n'est pas conservé chez hER β ni chez rtER γ . Néanmoins, hER β possède en position 264 un résidu sérine suivi d'un résidu proline. Ce résidu S264 est donc un substrat potentiel de la sérine/thréonine kinase.

Domaine A/B																	
hER α	101	NSV	SP	SPLML	LHPPP	QL	SP	PF	LQPHGQQVPY	YLENEPSGYT	VREAGPPAFY	RPNSDNRRQG	GRERLAS	TND	170		
hER β	72	--QT	TSPNV	L	WPTPGH	L	SP	--	LVVHRQLSHL	YAEPQK	SPWC	EARSLEHTLP	VNRETLKRRV	SGNRCASP	-- 136		
rtER γ	63	VFV	SS	SP---	--QL	SP	QL	SP	LHPPSHHGLP	SQSYLETSS	TPLYRSSVVT	AAEEKLCIAS	DRQQSYSAAG		133		
Domaine C					Domaine D												
hER α	231	KNRRK	S	CQAC	240				hER α	301	SKKNS	LALS	L	TADQMVSALL	DA	EPPILYSE	330
hER β	195	KNRRK	S	CQAC	204				hER β	254	RVRELLLDAL	SPEQLVLTLL	EAEP	PHVLIS		283	
rtER γ	192	RNRK	S	CQAC	201				rtER γ	266	GGGWRGPRIT	MPPEQVLFLL	QGQ	TPALCSR		285	
Domaine E/F																	
hER α	531	KNV	VPLY	DDL	540												
hER β	482	KNV	VPVY	DDL	491												
rtER γ	496	KNV	VPVY	DDL	505												

Figure 29 : Alignement des séquences en résidus aminoacides de hER α et rtER γ .

En jaune : sites de phosphorylation de hER α décrits dans la littérature. En gris : aminoacides homologues aux sites de phosphorylation de hER α .

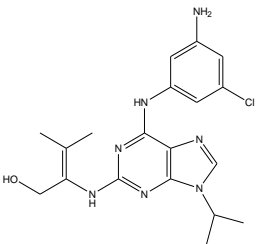
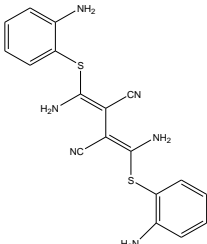
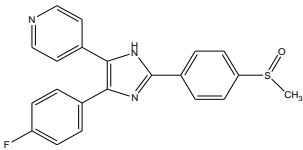
Ce chapitre présente une étude préliminaire de l'impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire et la localisation subcellulaire de hER α et de rtER γ . A cette fin, nous avons testé plusieurs inhibiteurs de kinases.

L'AminoPurvalanol A (AP, NG97) (Chang *et al.*, 1999) a été choisi car cette molécule inhibe fortement les Cdk 1, 2 et 5 ; les IC₅₀ (concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité maximale) mesurées *in vitro* sont de l'ordre de 20-30nM (Tableau 15). D'autre part, il a été montré que l'Aminopurvalanol A inhibait aussi efficacement les kinases ERK1 et ERK2 (Chang *et al.*, 1999; Knockaert *et al.*, 2002). De plus, de nombreuses études mettent en évidence les propriétés antiprolifératives des composés de la famille des purvalanols et notamment de l'AP (Gray *et al.*, 1998; Rosania *et al.*, 1999).

Le second inhibiteur de kinases que nous avons utilisé est l'U0126 (U, Tableau 15). Ce composé est un inhibiteur spécifique des kinases MEK1/2 (MAPK Kinase responsable de l'activation de ERK1/2). Vohra et collaborateurs comme Sheeler et collaborateurs ont testé l'action de l'U0126 et ont observé respectivement une diminution de la phosphorylation de PCM (MAPK du champignon *Pneumocystis carinii*) et hER α exprimé chez *S. cerevisiae* (Sheeler *et al.*, 2003; Vohra *et al.*, 2003). Ces observations nous indiquent qu'il existe une kinase cible de U0126 chez *S. cerevisiae*, que la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* est perméable à cette molécule et que la kinase inhibée est impliquée dans la phosphorylation de hER α .

Le troisième inhibiteur de kinases, le SB203580 (SB, Tableau 15), est un inhibiteur spécifique de la p38MAPK qui a été décrite, par Lee et Bai, comme responsable de la phosphorylation du résidu thréonine 311. Ce résidu aminoacide jouerait un rôle important dans la localisation nucléaire de hER α (Lee et Bai, 2002). Cet inhibiteur de kinases a déjà été testé chez *S. cerevisiae* : *in vivo*, il induit une inhibition de Hog1 (Vohra *et al.*, 2003).

Tableau 15 : Structure et IC₅₀ des inhibiteurs des kinases utilisés.

	Aminopurvalanol A (AP)	U0126 (U)	SB 203580 (SB)
Structure			
Kinases cibles et IC ₅₀	Cdk1/cycline B : 33nM Cdk2/cycline A : 33nM Cdk2/cycline E : 28nM Cdk5/p35 : 20nM ERK1 : 12 μ M ERK2 : 2,4 μ M (<i>in vitro</i>)	MEK1 : 72 nM MEK2 : 58 nM (<i>in vitro</i>)	p38MAPK : 40 nM (<i>in vitro</i>), 600 nM (<i>in cellulo</i>)
Références	(Gray <i>et al.</i> , 1998; Chang <i>et al.</i> , 1999; Rosania <i>et al.</i> , 1999; Knockaert <i>et al.</i> , 2000; Knockaert <i>et al.</i> , 2002; Le Breton <i>et al.</i> , 2003)	(DeSilva <i>et al.</i> , 1998; Duncia <i>et al.</i> , 1998; Favata <i>et al.</i> , 1998)	(Cuenda <i>et al.</i> , 1995; Godl <i>et al.</i> , 2003)

IV.2 Résultats du chapitre 4

IV.2.1 Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire de hER α et rtER β

L'impact des inhibiteurs de kinases sur l'activité cellulaire du récepteur aux œstrogènes humain (isotype α) et du récepteur de la truite arc-en-ciel (isoforme courte) a été analysé par des expériences de *trans*-activation *via* des mesures de l'activité de la β -galactosidase. La Figure 30 présente les résultats obtenus.

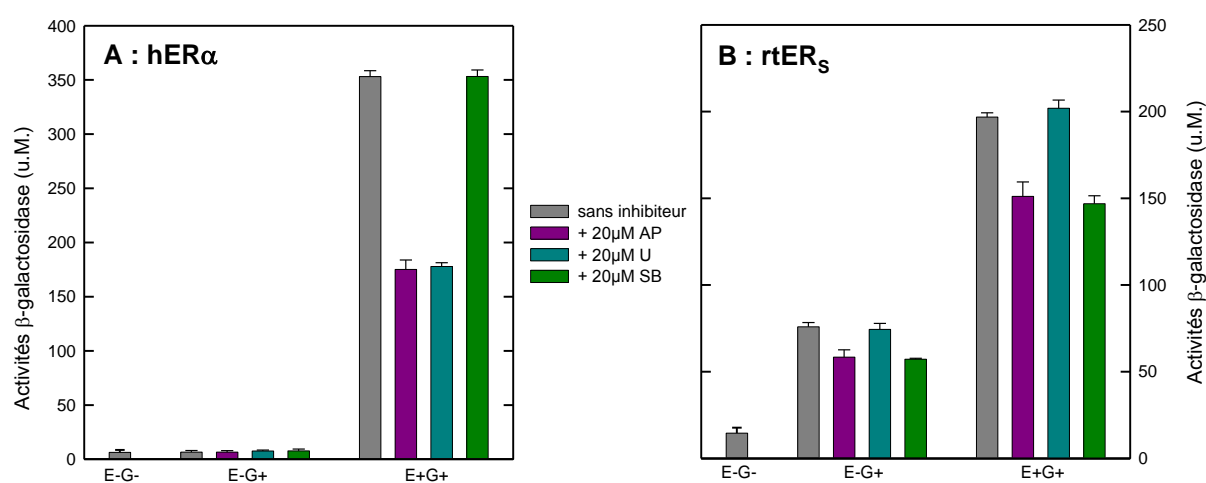


Figure 30 : Activités cellulaires de hER α et rtER β mesurées en présence ou non d'inhibiteurs de kinases et d'œstradiol.

Les levures *S. cerevisiae* ont été co-transformées par les plasmides pY60hER α (A) ou pY60rtER β (B) et YRPE2. Les activités β -galactosidase ont été mesurées dans différentes conditions : après induction (G+) ou non (G-) de l'expression du ER, en présence (E+) ou en absence (E-) d'œstradiol (10^{-7} M) et après ajout (violet, AP ; cyan, U ; vert, SB) ou non (histogramme gris) d'inhibiteur de kinases (20 μ M).

Nous observons que les levures co-transformées par le vecteur d'expression pY60hER α et le plasmide rapporteur YRPE2 (Figure 30A), avec ou sans induction par le galactose et en absence de stimulation hormonale par E2 (conditions expérimentales E-G- et E-G+), présentent une activité β -galactosidase basale quasiment nulle. En présence d'œstradiol, l'activité cellulaire de hER α est fortement augmentée et atteint une valeur de $353,05 \pm 5,45$ u.M., comme ce qui a déjà été observé dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Watanabe *et al.*, 1997) ou encore dans les cellules embryonnaires de rein humain (HEK293) (Pettersson *et al.*, 2000). L'ajout de 20 μ M d'Aminopurvalanol A ou de U0126 a pour effet

d'abaisser de 50% l'activité β -galactosidase mesurée ($175,15 \pm 8,72$ u.M. en présence de AP et $177,84 \pm 3,57$ u.M. en présence de U). La présence de SB n'a aucun effet.

Les levures exprimant le rtER_S présentent une activité cellulaire basale ($14,59 \pm 3,17$ u.M.) dans les conditions E-G- (Figure 30B). Lorsque l'expression du rtER_S est induite, nous observons une activité β -galactosidase très importante : $75,87 \pm 2,48$ u.M. (condition E-G+). Le rtER_S possède donc bien une activité E2 indépendante. Ceci est concordant avec la littérature et nos précédentes observations (Petit *et al.*, 1995; Bouter, 2003). En présence de 10^{-7} M en E2, l'activité cellulaire du récepteur est augmentée d'un facteur 2,5 ($196,81 \pm 2,49$ u.M.) mais est inférieure à celle de $\text{hER}\alpha$ ($353,05 \pm 5,45$ u.M.). Contrairement à U qui n'induit aucun effet, l'ajout de AP ou de SB a pour conséquence de diminuer l'activité cellulaire du rtER_S de 25% aussi bien en présence ou qu'en absence de E2.

Nos résultats montrent que les inhibiteurs de kinases ont un effet différent selon le récepteur aux œstrogènes étudié. Ces résultats sont discutés dans la section IV.3.

IV.2.2 Impact de la phosphorylation sur l'activité cellulaire de $\text{GFPPhER}\alpha$ et GFPrtER_S

Afin de suivre leur localisation subcellulaire, l'isotype α du récepteur aux œstrogènes humain et l'isoforme courte du récepteur de la truite arc-en-ciel ont été fusionnés à une protéine fluorescente : la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à vérifier que cette fusion à la GFP n'affectait pas la fonctionnalité des ER. Ainsi nous avons mesuré leur activité cellulaire dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées précédemment dans le cas des ER non fusionnés.

Nous remarquons, Figure 31, que les activités β -galactosidase mesurées pour les GFPER sont plus faibles d'environ 40% par rapport aux activités obtenues pour les protéines non fusionnées : $\text{Activité}_{(\text{GFPPhER}\alpha \text{ E+G+})} = 208,82 \pm 1,03$ u.M. et $\text{Activité}_{(\text{GFPrtER}_S \text{ E+G+})} = 133,51 \pm 1,37$ u.M.. $\text{GFPPhER}\alpha$ possède comme $\text{hER}\alpha$ une activité cellulaire uniquement en présence d'hormone alors que GFPrtER_S , comme rtER_S , présente en plus une activité indépendante de la présence de l'hormone (Figure 31, histogrammes gris). Tandis que l'activité cellulaire de $\text{GFPPhER}\alpha$ n'est pas affectée par SB, l'ajout de $20\mu\text{M}$ de AP ou de U dans les milieux de culture entraîne, en présence de E2, une baisse de cette activité de près de 50% comme observée précédemment pour $\text{hER}\alpha$. D'autre part, que le rtER_S soit fusionné ou non à la GFP,

en présence ou non d'œstradiol et de 20 μ M d'Aminopurvalanol A ou de SB203580, l'activité β -galactosidase mesurée est 25% plus faible que celle obtenue en absence d'inhibiteur de kinases ou en présence de U0126.

Ces résultats démontrent que les récepteurs aux œstrogènes fusionnés à la GFP possèdent les mêmes propriétés fonctionnelles que les protéines natives.

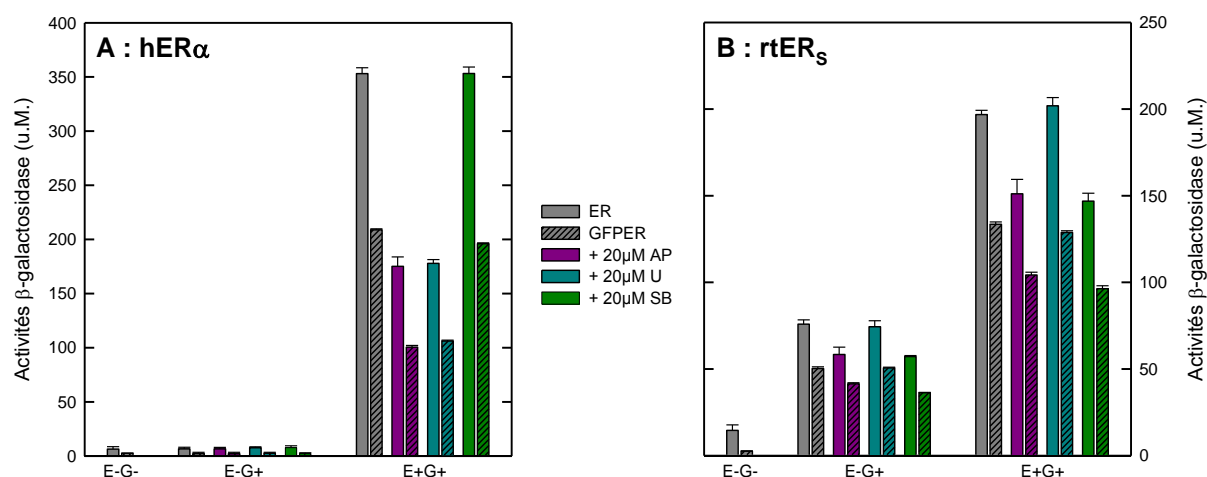


Figure 31 : Comparaison des activités cellulaires de hER α et rtER s fusionnés ou non à la GFP.

Les levures *S. cerevisiae* ont été co-transformées par les plasmides pY60(GFP)hER α (A) ou pY60(GFP)rtER s (B) et YRPE2. Les histogrammes hachurés correspondent aux activités des récepteurs fusionnés à la GFP. Les activités β -galactosidase ont été mesurées dans différentes conditions : après induction (G+) ou non (G-) de l'expression du ER, en présence (E+) ou en absence (E-) d'œstradiol à 10⁻⁷M et après ajout (violet, AP ; cyan, U ; vert, SB) ou non (histogrammes gris) d'inhibiteur de kinases à 20 μ M.

Afin de rejeter l'hypothèse que les différences d'activité cellulaire observées dans chacune des conditions (\pm E2 et \pm inhibiteur de kinases) pourrait provenir d'une différence de croissance des levures ou de synthèse du ER, nous avons analysé les DO_{600nm} des suspensions levuriennes, comme indicateur de la croissance et réalisé des Western Blot sur des extraits protéiques pour estimer la quantité intracellulaire de ER produit. Ne possédant pas d'anticorps spécifiques du rtER s , nous avons choisi d'utiliser un anticorps dirigé contre la GFP covalamment fixée aux ER. Nous montrons que ni E2 ni les inhibiteurs de kinases n'affectent la croissance des cellules et la synthèse de GFP hER α (Figure 32 A) ; des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de hER α . En ce qui concerne GFP rtER s , nous remarquons qu'en présence de E2, il y a apparition d'un

doublet au niveau de la bande correspondant au récepteur (Figure 32 B). Sheeler et collaborateurs ont également observé un doublement de la bande correspondant à hER α en présence de 10^{-8} M de E2 (Sheeler *et al.*, 2003). Ils suggèrent que ces deux bandes correspondent à deux états de phosphorylation différents du récepteur. Afin d'étayer leur hypothèse, ils ont incubé les levures avec 1 μ M d'U0126 et notent une légère diminution de l'intensité de la seconde bande en présence de E2. Dans notre cas, la présence d'inhibiteurs de kinases (20 μ M) ne modifie pas l'intensité des bandes observées (Figure 32 B). Nous pouvons émettre les hypothèses suivantes : (i)- les différents états de phosphorylation du rtER_s sont modulés par des kinases différentes des MAPKs et des CDKs ; (ii)- il s'agit d'une autre modification post-traductionnelle (acétylation, palmitoylation, glycosylation, sumoylation) ; (iii)- contrairement à hER α qui, dans nos conditions expérimentales, ne présente pas de doublement de bande, rtER_s serait l'unique cible d'une modification post-traductionnelle.

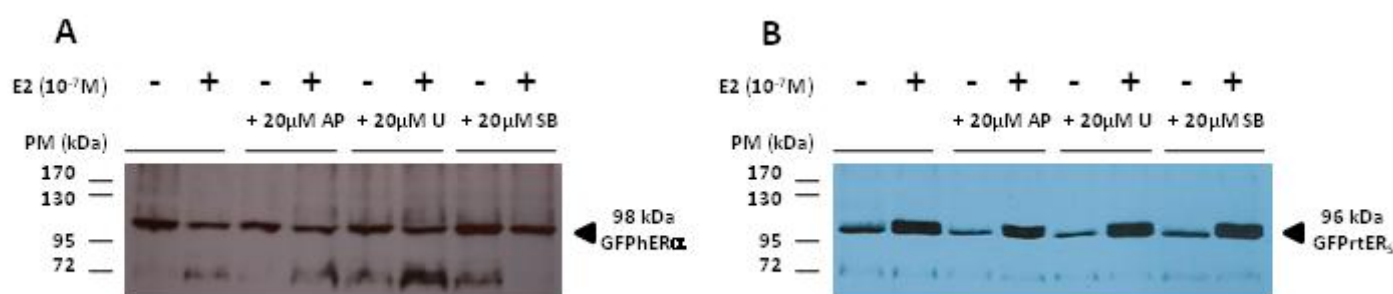


Figure 32 : Analyse protéique en Western Blot des extraits issus de culture de *S. cerevisiae* exprimant GFPHER α (A) ou GFPrtER_s (B) en fonction de la présence ou non d'œstradiol et d'inhibiteur de kinases.

Les extraits protéiques sont obtenus après la lyse des levures par le réactif de Pierce additionné d'inhibiteurs de protéases. La quantité de protéines totales de ces extraits est déterminée par la méthode de Lowry. 30 μ g de protéines totales de chaque extrait sont déposés sur gel de polyacrylamide (10%) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les niveaux d'expression des GFPER sont visualisés en détectant la GFP fusionnée aux ER à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la GFP. Film *Classic Blue Autoradiography BX*, Midsci pendant 15 min. E2, 17 β -œstradiol, AP, Aminopurvalanol A, U, U0126, SB, SB203580.

IV.2.3 Impact de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de GFPhER α et GFPrtER ς

Par microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence, nous avons analysé la localisation subcellulaire des deux récepteurs aux œstrogènes fusionnés à la GFP. Pour cela, nous avons réalisé un triple marquage (regroupées dans le Tableau 16). Les sondes fluorescentes utilisées sont le FPMM4-64 (marqueur des structures membranaires, en rouge sur les photos du Tableau 16), le DRAQ5 (marqueur de la chromatine, en bleu sur les photos du Tableau 16) et la GFP fusionnée aux deux ER exprimées (en vert sur les clichés du Tableau 16). Les mesures ont été effectuées en présence ou non de E2 (10^{-7} M) et/ou d'inhibiteurs de kinases (20 μ M).

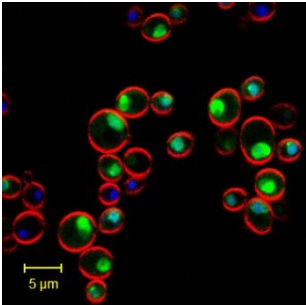
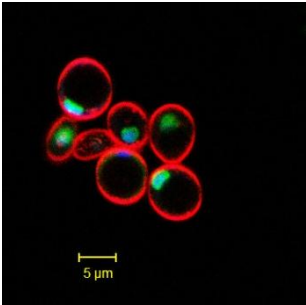
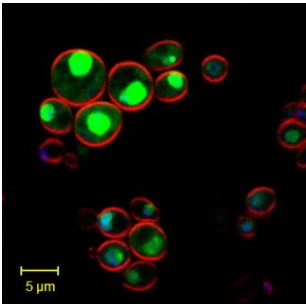
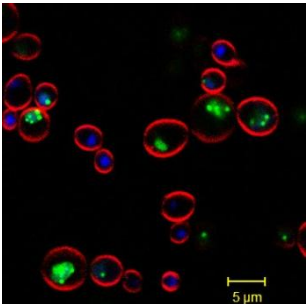
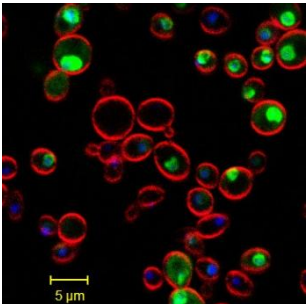
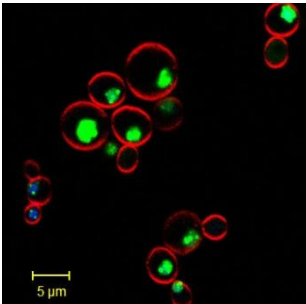
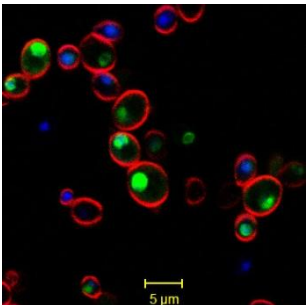
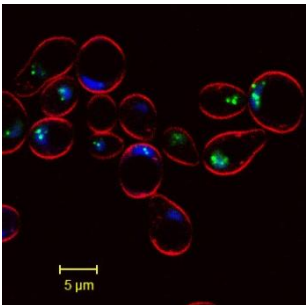
Comme ce qui a été observé dans le chapitre précédent, une grande majorité de GFPhER α colocalise avec le noyau des cellules *S. cerevisiae*. D'autre part, en absence d'hormone, GFPhER α est uniformément réparti dans le noyau en absence de E2 et, forme des *foci* sous stimulation hormonale (Tableau 16A). En ce qui concerne GFPrtER ς , en l'absence de ligand, il apparaît que le récepteur se trouve réparti uniformément dans toute la cellule ; alors qu'en présence d'œstradiol, nous remarquons la présence de *foci* intenses en dehors du noyau (Tableau 16B).

D'autre part, quel que soit le récepteur aux œstrogènes, l'ajout de 20 μ M d'inhibiteurs de kinases dans le milieu de culture ne provoque pas de différences notables de leur localisation subcellulaire, suggérant que la localisation des ER n'est pas régulée par les sites de phosphorylation ciblés par les inhibiteurs.

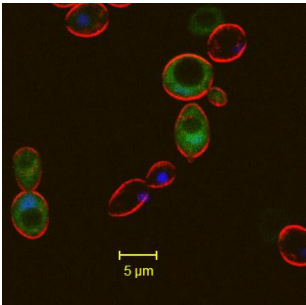
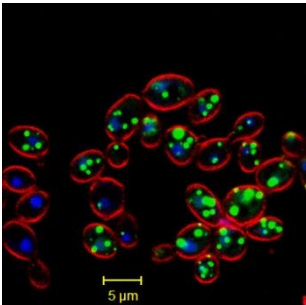
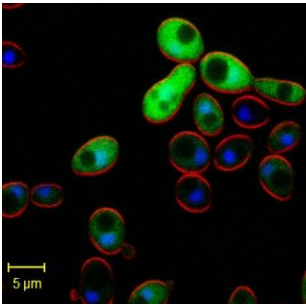
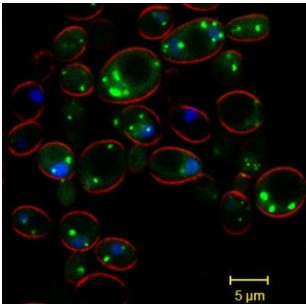
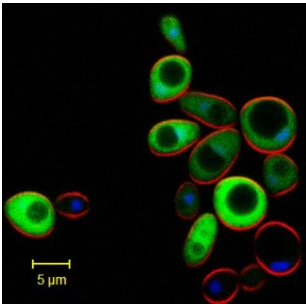
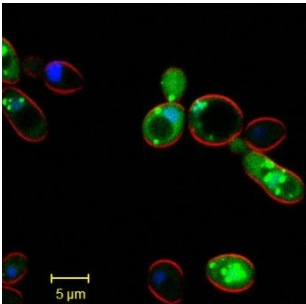
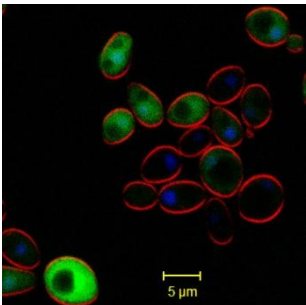
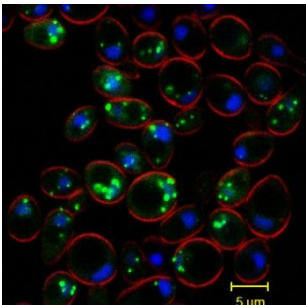
Tableau 16 : Localisation subcellulaire de GFPhER α (A) ou GFPrTER $_S$ (B) exprimés chez *S. cerevisiae* en fonction de la présence ou non d'œstradiol et/ou d'inhibiteur de kinases.

Clichés de levures *S. cerevisiae* transformées par pY60GFPhER α (A) ou pY60GFPrTER $_S$ (B) obtenus par microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence. La fluorescence de la GFP est visualisée en vert ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 488/505-550\text{nm}$). La chromatine, en bleu sur les photos, est marquée au DRAQ5 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 633/>650\text{nm}$). Le FPMM4-64 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 543/>560\text{nm}$, en rouge) se lie spécifiquement à la membrane plasmique des levures.

A

GFPhER α	Sans hormone	+ 10 ⁻⁷ M E2
Ø		
+ 20μM AP		
+20μM U		
+20μM SB		

B

GFPrtER _s	Sans hormone	+ 10 ⁻⁷ M E2
Ø		
+ 20µM AP		
+20µM U		
+20µM SB		

IV.3 Discussion du chapitre 4

De nombreux travaux ont montré que l'activité cellulaire du récepteur aux œstrogènes était modulée par les corégulateurs (Bourguet *et al.*, 2000; Ascenzi *et al.*, 2006) et son état de phosphorylation (Ascenzi *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006). Huit résidus aminoacides de hER α ont été identifiés comme cibles de phosphorylation. Il s'est avéré que les quatre résidus sérine phosphorylés du domaine A/B jouent un rôle important dans l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet, leur substitution par un résidu alanine abaisse son activité cellulaire (Ali *et al.*, 1993; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996; Joel *et al.*, 1998a; Joel *et al.*, 1998b; Endoh *et al.*, 1999; Dutertre et Smith, 2003; Sheeler *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2006). La phosphorylation du rtER ς n'est pas décrite dans la littérature.

L'objectif de cette étude préliminaire était, d'une part, de vérifier que la phosphorylation joue bien un rôle dans l'activité cellulaire de hER α exprimé chez *S. cerevisiae* et d'autre part, d'observer si cette modification post-traductionnelle module également l'activité de rtER ς . Nous nous sommes donc attachés à chercher une expérience simple et rapide, à la fois pour sa mise en place et pour l'obtention et l'analyse des résultats. Nous avons donc choisi de mesurer l'activité cellulaire des ER *via* des mesures de l'activité β -galactosidase en présence d'œstradiol et/ou d'inhibiteurs de kinases. Parallèlement à ces expériences, nous avons suivi la localisation subcellulaire des récepteurs aux œstrogènes afin d'observer si elle est également modulée par l'état de phosphorylation des ER.

Les activités cellulaires mesurées en présence d'inhibiteurs de kinases montrent que ces derniers agissent différemment selon le récepteur aux œstrogènes. Les analyses protéiques effectuées en Western-Blot (Figure 32) sur des extraits cellulaires de hER α ou rtER ς prouvent que les différences d'activité β -galactosidase observées proviennent d'une différence de fonctionnalité du récepteur et non pas d'une différence de synthèse de ce dernier.

Parmi les 3 inhibiteurs de kinases testés, seul l'Aminopurvalanol A induit une inhibition de l'activité cellulaire des deux ER (Figure 30). AP est un inhibiteur des CDKs et des kinases ERK1/2. Or, il a été montré d'une part que la phosphorylation des résidus sérine 104, 106 et 118 pouvait être induite par une CDK (Cdk2 pour S104 et S106, Cdk7 pour S118) ou ERK1/2 et, d'autre part, que l'inhibition de la phosphorylation de ces résidus (ou une substitution par un résidu alanine) affectait considérablement l'activité transcriptionnelle du hER α (Ali *et al.*, 1993; Le Goff *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1995a; Bunone *et al.*, 1996; Joel *et al.*, 1998b; Endoh

et al., 1999; Chen *et al.*, 2000b; Dutertre et Smith, 2003; Lannigan, 2003; Sheeler *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2008). La diminution de l'activité cellulaire de hER α que nous observons pourrait provenir d'une inhibition d'une ou plusieurs kinases homologues aux Cdk1, 2, 5 ou ERK1/2 chez *S. cerevisiae* : Cdc28, Pho85, Fus3, Kss1 et/ou Slt2. L'inhibition de l'activité cellulaire par U0126 montre également l'implication de ERK1/2 dans la régulation de l'activité cellulaire de hER α . Nos résultats sont en accord avec des travaux publiés récemment rapportant que la présence de cet inhibiteur affecte l'activité transcriptionnelle de hER α et ce, dans différents types cellulaires (cellules de rein ou cellules MCF-7) (Dang et Lowik, 2004; Masuhiro *et al.*, 2005). Par ailleurs, nous montrons que la présence de SB203580 n'induit aucune modification de l'activité cellulaire de hER α alors que Lee et Bai ont observé une diminution de 60% de cette activité dans les cellules d'Ishikawa (Lee et Bai, 2002). Il est à noter que la concentration en inhibiteur que nous avons testée (20 μ M) est deux fois moins importante que celle utilisée par Lee et Bai (50 μ M) mais qu'à cette concentration, nous observons un effet sur l'activité de rtER β donc la kinase a bien été inhibée.

L'alignement des séquences primaires de hER α et rtER β (Figure 18) révèle que rtER β possède des résidus sérine (S66, S68 et S76) homologues aux résidus sérine 104, 106 et 118 phosphorylés de hER α . L'ajout de AP dans le milieu de culture induit une inhibition de 25% de l'activité cellulaire du rtER β . Cette diminution pourrait provenir d'une inhibition de la phosphorylation des résidus S66, S68 et/ou S76 par des CDKs ou des MAPKs. L'activité cellulaire du rtER β étant diminuée d'un même facteur en présence et en absence d'œstradiol, nous pouvons dire que le phénomène observé est indépendant de la présence de E2 et de sa fixation sur le récepteur. D'autre part, nous montrons que la présence de U0126 n'induit pas d'effet sur l'activité cellulaire de rtER β . Nous pouvons émettre l'hypothèse que rtER β présente, dans sa séquence, des sites de phosphorylation reconnus par des CDKs mais est dépourvu de sites de phosphorylation spécifiques des kinases ERK1/2. rtER β ne possède pas de résidu thréonine homologue au résidu T311 de hER α phosphorylé par p38MAPK et décrit comme responsable de la translocation du récepteur du cytoplasme vers le noyau. Toutefois, la présence de SB203580, inhibiteur spécifique de la p38MAPK, a pour effet de diminuer de 25% l'activité cellulaire de rtER β en présence ou non de E2 (Figure 30). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse de l'existence, chez rtER β d'un ou plusieurs résidus aminoacides phosphorylés par la p38MAPK.

En résumé, nous montrons que les CDKs comme les MAPKs sont impliquées dans la régulation de l'activité cellulaire des deux récepteurs aux œstrogènes étudiés. Néanmoins,

selon le récepteur, les MAPK impliquées sont différentes : ERK1/2 pour hER α et p38MAPK pour rtER β . Ceci expliquerait la différence du pourcentage d'inhibition observée entre les deux récepteurs (50% pour hER α et 25% pour rtER β), en présence de AP. De plus, contrairement à U0126 et SB203580, l'action de l'Aminopurvalanol A n'avait encore jamais été testée chez *S. cerevisiae* (Sheeler *et al.*, 2003; Vohra *et al.*, 2003). Nos résultats prouvent que la paroi de levure est perméable à l'Aminopurvalanol A et qu'il existe chez *S. cerevisiae* une (ou des) cible(s) de cette molécule.

Les expériences menées en microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence ne montrent aucun effet des inhibiteurs de kinases sur la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes, suggérant que la localisation n'est pas régulée par les phosphorylations ciblées par les inhibiteurs.

Ces premiers résultats obtenus sont en accord avec la littérature qui décrit un rôle important de la phosphorylation dans la fonction du récepteur aux œstrogènes. Mais, du fait du très grand nombre de fonctions modulées par les kinases (cycle cellulaire, maintien de l'homéostasie, régulation de la synthèse protéique, survie et prolifération cellulaire), ces études préliminaires ne permettent pas de conclure quant à un effet direct de ces inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation des récepteurs aux œstrogènes ou à un effet indirect qui pourrait impliquer, entre autre, la phosphorylation de corégulateurs (Osborne *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2008).

Afin d'affirmer ou d'infirmer les hypothèses émises ici, il sera indispensable de mener des expériences complémentaires. L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les résidus aminoacides phosphorylés pourrait nous permettre d'apporter plus de précisions sur les cibles des inhibiteurs de kinases testés. La substitution des résidus aminoacides phosphorylés par des résidus alanine (pour abolir la phosphorylation) ou par des résidus glutamate (pour mimer une phosphorylation) par mutagénèse dirigée pourrait nous permettre d'observer plus précisément leur implication dans la fonction et la localisation subcellulaire du récepteur aux œstrogènes.

DISCUSSION GENERALE

Des déficiences en œstrogènes sont impliquées dans des pathologies aussi variées que l'artériosclérose, l'ostéoporose et ou encore les processus dégénératifs du système nerveux central (Fillit *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1986; Turner *et al.*, 1994; Parl, 2000). A l'opposé, un niveau hormonal trop élevé conduit à la formation de tumeurs (Parl, 2000). L'action de ces œstrogènes est médiée par le récepteur aux œstrogènes et il a été observé que leurs effets sont étroitement dépendants du contexte cellulaire. Une des conséquences notables est que le traitement d'une tumeur particulière entraînera des effets secondaires indésirables dans les organes autres que celui visé par la thérapie (Assikis *et al.*, 1996; O'Regan *et al.*, 1998; Southcott, 2001). Toute approche visant à mettre au point de nouvelles molécules anti-tumorales devra donc anticiper ces effets secondaires ce qui implique une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'activité cellulaire de ces récepteurs. Cette activité dépend du contexte cellulaire par la présence de corégulateurs particuliers, par les caractéristiques physico-chimiques des compartiments subcellulaires et bien sûr selon la nature et les taux d'hormones circulants (Watanabe *et al.*, 1997; Cowley et Parker, 1999). Il est par exemple communément admis que hER α joue un rôle déterminant dans l'initiation et la progression tumorale mammaire tandis que de récentes études ont suggéré que hER β pouvait contrer cette progression tumorale mammaire (Paruthiyil *et al.*, 2004; Ström *et al.*, 2004). Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain répondent différemment vis-à-vis de certains ligands (Watanabe *et al.*, 1997; Barkhem *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 1998) et ces différences sont utilisées par l'industrie pharmaceutique afin de synthétiser de nouveaux ligands sélectifs de l'un ou l'autre des isotypes du hER pour traiter les cancers ou les symptômes de la ménopause, de l'ostéoporose, etc. Il est donc indispensable de comprendre parfaitement les effets agonistes ou antagonistes des molécules testées.

L'étroite intrication de ces facteurs dans la réponse cellulaire aux stimuli hormonaux rend extrêmement complexe la conception d'un modèle biologique unique permettant de tester des hypothèses sur le fonctionnement *in situ* de ces récepteurs.

Notre parti a été de mener de front deux approches complémentaires, *in cellulo* et *in vitro* afin de corrélérer réponse cellulaire et comportement des macromolécules, et ce, en menant une étude comparative sur des récepteurs d'espèces différentes (homme et truite).

Pour mener l'étude au niveau cellulaire, nous avons choisi le modèle « levure » qui présente à nos yeux plusieurs avantages :

Premièrement, il permet de comparer, dans un même système d'expression la fonctionnalité d'ER provenant d'espèces différentes. Les différences d'activité observées ne

pourront donc pas provenir de contextes cellulaires différents, ce qui réduit le risque d'interprétations erronées des résultats expérimentaux.

Deuxièmement, le système levure ne contenant pas de récepteur aux œstrogènes ni d'œstradiol endogènes, les effets observés ne seront pas biaisés par l'activation de voies métaboliques secondaires par rapport à notre étude.

Troisièmement, ce système est parfaitement adapté pour suivre en parallèle l'activité cellulaire et les phénomènes de translocation nucléo-cytoplasmique.

Quatrièmement, les machineries transcriptionnelles chez l'homme et la levure sont analogues. D'autre part, plusieurs corégulateurs du récepteur aux œstrogènes ont été mis en évidence chez la levure (Tableau 17).

Cinquièmement, du fait que les protéines kinases sont très conservées chez les eucaryotes (Widmann *et al.*, 1999), le système levure est adapté à l'étude du rôle des phosphorylations dans le mécanisme d'action des récepteurs aux œstrogènes.

Sixièmement enfin, le système d'expression « levure » est stable, peu coûteux à mettre en œuvre et a déjà été utilisé pour caractériser le récepteur de la truite (Petit *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1999; Metivier *et al.*, 2000a; Pakdel *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000; Bouter *et al.*, 2005).

Les différences de fonctionnalité qui distinguent les deux isotypes du récepteur humain soulignent à l'évidence que leur activité dépend étroitement de leur capacité à interagir avec leurs ligands (hormones et ERE), capacité qui dépend de facteurs structuraux, thermodynamiques, cinétiques et dynamiques. Décrire sous ces quatre aspects le comportement des récepteurs humains constitue donc une étape incontournable de l'étude des mécanismes d'activation de la transcription. Dire ceci revient à prendre explicitement en compte le contexte physico-chimique de la cellule comme un paramètre décisif de la réponse cellulaire à une stimulation hormonale. A cette fin, conduire une étude comparative entre différents récepteurs, de structures donc distinctes, constitue un moyen efficace pour aborder la complexité du comportement des macromolécules qui découlent de l'intégration des fonctionnalités de leurs différents domaines structuraux. Pour donner du *contraste* à cette étude comparative, nous avons décidé de l'étendre au récepteur de la truite arc-en-ciel qui présente des caractéristiques extrêmement intéressantes dans notre optique notamment du fait qu'il régule la synthèse de vitellogénine dont la synthèse est à la fois massive mais aussi très transitoire (Maitre *et al.*, 1985; Pakdel *et al.*, 1991; Flouriot *et al.*, 1997). Dans ces circonstances, un système puissant d'amplification mais aussi finement régulé a du être sélectionné par la pression évolutive.

Notre étude avait pour but dans un premier temps d'identifier l'ERE imparfait présent dans la région promotrice des gènes vitellogénine de la truite arc-en-ciel puis de rechercher l'impact de cette « dégénérescence » sur la régulation transcriptionnelle et les paramètres physico-chimiques de l'interaction hER-ERE.

Bien qu'il soit reconnu que le gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel soit induit par l'œstradiol aucune séquence ERE n'avait été identifiée dans son promoteur. Par des outils de bioinformatique, de biologie moléculaire, cellulaire et de biophysique, nous avons pu mettre en évidence que la séquence GGGGCAnnnTAACCT localisée à - 180 pb du site d'initiation de la transcription correspondait à une séquence ERE imparfaite. La conséquence de la présence d'un ERE dégénéré par rapport à un ERE consensus dans la région promotrice du gène rapporteur est une activité cellulaire plus faible du récepteur et, dans le cas du rtER_S, un facteur de stimulation hormonale plus élevé. Ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse d'une surproduction contrôlée de vitellogénine. En effet, la stimulation par E2 aurait tout d'abord pour conséquence de surproduire le rtER_S puisque la séquence ERE retrouvée dans la région promotrice de son gène ne montre qu'un seul nucléotide divergent de la séquence consensus, ce qui impliquerait une plus forte affinité comparée à *rtvtgERE*. Une fois que le taux cellulaire de récepteur ait atteint un certain seuil, la *trans*-activation des 20 gènes de la vitellogénine peut alors se produire. On voit alors que la faible activité cellulaire et la plus faible sensibilité vis-à-vis de E2 observées ne constituent pas un désavantage pour deux raisons : la première est, qu'en période de reproduction, elle sera compensée par la forte amplification du gène vitellogénine ; la seconde car elle est le garant d'une absence d'expression hors de la période de reproduction ce qui aurait des conséquences néfastes en termes d'économie énergétique de la cellule. La présence d'un ERE imparfait identifié dans le génome de la truite n'est certainement pas une caractéristique exotique ou à tout le moins étrangère à l'étude du récepteur humain. En effet il faut se souvenir que, chez l'homme, seuls 2 ERE sur 25 sont des ERE consensus. Cela met en lumière le fait qu'une interaction trop forte entre l'ER et son ADN cible peut avoir des conséquences néfastes sur la capacité à réguler efficacement la transcription du gène cible. Le modèle « truite » est donc parfaitement adapté, structuralement et fonctionnellement, à une étude comparative pour appréhender les spécificités des isotypes humains.

A la suite de cette étude préalable, notre objectif a été de caractériser *in vitro* le comportement conformationnel, thermodynamique, et dynamique de ces ER dans des contextes physico-chimiques distincts. La démarche ici repose clairement sur le postulat qu'une meilleure compréhension de ces comportements ouvrira une porte pour interpréter la

réponse cellulaire liée à l'activité de ces récepteurs au regard des conditions qui prévalent dans la cellule.

La séquence des événements liés à la *trans*-activation de gènes s'énonce comme i) la fixation de l'hormone sur le récepteur, ii) la dissociation du complexe hormone-récepteur de complexes transitoires et iii) la fixation sur les séquences ERE de l'ADN cible (Curtis et Korach, 1991; Ylikomi *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2002; O'Malley, 2005). Nous avons donc cherché à caractériser, dans différentes conditions physico-chimiques, les conséquences de la fixation du ligand sur la stabilité et flexibilité conformationnelles du récepteur ligandé, et sur son affinité vis-à-vis des ERE. Nos travaux ont permis de corréler la moindre activité transcriptionnelle de l'isotype humain β par rapport à l'isotype α avec une plus faible affinité du hER β pour l'ERE et l'existence d'une structure moins contrainte. Il est en effet connu qu'une forte flexibilité conformationnelle permet d'établir des interactions multiples entre partenaires formant un complexe moléculaire (Tang et Dill, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2000; Celej *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2003). Nous avons recherché des informations complémentaires sur la nature des interactions stabilisant ces complexes hER-ADN humains. Pour cela des expérimentations reposant sur le screening progressif des interactions électrostatiques entre hER et ERE ont été menées en faisant croître la concentration saline. Il en ressort très nettement pour les deux isotypes humains que ces interactions jouent un rôle important sur la force des complexes puisque l'affinité des ER varie de manière inversement proportionnelle avec la force ionique. Cet effet est le plus marqué pour l'isotype β comme le montre l'augmentation d'un facteur 3 de la constante de dissociation quand la concentration saline passe de 80 à 200 mM. Un effet ERE dépendant est encore plus marqué si l'on compare l'effet de sel sur la fixation de l'ERE_{cs} à celui sur la fixation de *rtvtg*ERE. Il apparaît clairement que la stabilité du complexe ER, quelque soit l'isotype, avec le *rtvtg*ERE repose quasi exclusivement sur des interactions coulombiennes comme le démontre la très grande valeur de la constante de dissociation mesurée à 200 mM de KCl. La manifestation de cet effet de sel étroitement dépendant du type d'ERE cible, et dans une plus faible mesure de l'isotype concerné laisse entrevoir comment l'activité transcriptionnelle *in vivo* peut être modulée par des contre-ions qu'ils soient apportés par les ions ou par les corégulateurs. A l'évidence, la modulation du réseau électrostatique au sein des récepteurs doit jouer un rôle majeur dans les différences de fonctionnalités rapportées dans la littérature (Mosselman *et al.*, 1996; Pettersson *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998a; Cowley et Parker, 1999; Hall et McDonnell, 1999; Hanstein *et al.*, 1999).

Les conditions opératoires utilisées permettant de travailler sur ces espèces moléculaires en solution, il était tentant d'atteindre la stabilité conformationnelle des isotypes en fonction de la température. Cette étude a montré, point essentiel, qu'à la température physiologique de 37°C, les deux isotypes humains du récepteur aux œstrogènes présentaient une conformation instable. Plus précisément, hER β présente une faible stabilité thermique quelque soit la concentration saline tandis que hER α présente une relativement forte stabilité thermique à faible force ionique (80 mM KCl) qui décroît significativement à 200 mM KCl pour rejoindre celle de l'isotype β . L'origine de cette différence de comportement vis-à-vis des contre-ions est sans doute à rechercher dans la structuration secondaire des protéines puisque l'isotype α possède une structuration de type hélice plus prononcée. Quoiqu'il en soit, ces expériences montrent que le récepteur aux œstrogènes humain non ligandé est peu stable à la température physiologique. Il est tentant de rapprocher cette caractéristique du fait que, en absence de stimulation hormonale, ces récepteurs sont piégés de manière transitoire au sein de complexes. De là à évoquer un rôle chaperon des dits complexes transitoires il n'y a qu'un pas. Parallèlement, cette faible stabilité conformationnelle pourrait promouvoir le recrutement des formes dissociées du récepteur par les protéases ce qui contribuerait au turn-over court de molécules à haute activité biologique. La désactivation de transcription serait ainsi basée sur une compétition cinétique entre deux phénomènes : la complexation et la dénaturation. Il sera sans doute possible de tester cette hypothèse puisque notre protocole de mesure de stabilité conformationnelle est parfaitement adapté à la mesure de cinétiques de dénaturation : le simple suivi temporel des propriétés d'émission de fluorescence des récepteurs permettra d'accéder aux paramètres cinétiques de ce phénomène.

Ces perspectives montrent qu'une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques mesurées *in vitro* est indispensable pour appréhender et comprendre le comportement et le rôle des ER dans la cellule.

Sur cette base nous avons ensuite cherché à établir certains aspects du comportement et des mécanismes sous-jacents aux fonctions assurées par le récepteur humain dans la cellule. Comme précisé précédemment, cela ne peut se faire que sur un environnement cellulaire maîtrisé. C'est un des atouts notables du système levure.

Dans un premier temps nous avons établi les variations de sensibilité d'un ER humain (isotype α) et de truite aux œstrogènes et anti-œstrogènes. Nous montrons que sensibilité à l'hormone, telle qu'estimée par la valeur de l'EC₅₀ de l'hormone pour la *trans*-activation, et amplitude de ce phénomène sont corrélées. De plus l'isotype humain α est systématiquement

plus sensible (EC_{50} plus faibles) que l'ER de truite aux hormones. La sensibilité décroît pour les ligands de la manière suivante : $E2 > DES > (ICI \text{ seulement pour } rtER_S) > 4-OHT > RAL$. Il est à noter que nos résultats ont montré que, comme ce qui a été précédemment décrit, l'ICI exerçait un effet antagoniste pur vis-à-vis de $hER\alpha$ alors qu'un effet antagoniste partiel a été observé pour le récepteur de truite (Le Drian *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1995; Howell *et al.*, 2000; Robertson, 2001; Escande *et al.*, 2006; Leanos-Castaneda et Van Der Kraak, 2007). Certes, le protocole expérimental utilisé pour cette étude englobe plusieurs étapes depuis la fixation du ligand jusqu'à la *trans*-activation, mais il devra être possible, sur de telles bases, d'affiner nos connaissances en ce qui concerne l'impact des facteurs structuraux des récepteurs sur leurs fonctionnalités.

Dans un second temps, une étude simultanée de l'analyse cinétique de la stimulation hormonale et de la redistribution subcellulaire des récepteurs humains et de truite a été conduite. Bien entendu, la translocation nucléo-cytoplasmique constitue un moyen efficace pour réguler l'activité du récepteur. Il est donc intéressant de comparer les ER provenant d'espèces différentes pour identifier les facteurs clés de la localisation subcellulaire du récepteur. Cette étude a nécessité de vérifier au préalable que la fusion à la GFP ne modifiait pas la fonctionnalité des récepteurs. Un résultat majeur de cette étude est que cinétiques de stimulation hormonale et translocation constituent des phénomènes distincts puisque la *trans*-activation survient quelques heures après la stimulation hormonale alors que la translocation où la relocalisation au sein de *foci* ne nécessite que quelques minutes. La présence de ces *foci* maintes fois observée reste une énigme ; nous démontrons par Western Blot qu'aucune dégradation des ER ne survient ce qui permet d'exclure la possibilité que ces *foci* soient des protéasomes. Là encore nous observons des comportements distincts pour les deux récepteurs :

Concernant les aspects cinétiques de la stimulation hormonale, elles sont indépendantes du ligand pour le récepteur humain alors qu'elles sont plus lentes pour les ligands agonistes pour le récepteur de truite.

Concernant la localisation subcellulaire, $hER\alpha$ toujours nucléaire, évolue d'une distribution diffuse vers une relocalisation au sein de *foci* tandis que le récepteur de truite passe d'une distribution diffuse homogène à une relocalisation au sein de *foci*.

Les aspects cinétiques, nous l'avons vu, nous poussent à distinguer translocation et activation transcriptionnelle. Cela est conforté par les études qui ont montré que la présence d'œstradiol n'est pas indispensable pour que le récepteur se fixe de manière spécifique sur son ADN cible (Murdoch *et al.*, 1990). Par contre, il a été rapporté que E2 stimule la phosphorylation du

récepteur (Joel *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002; Lannigan, 2003; Ascenzi *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006). Un niveau de phosphorylation élevé augmente le caractère anionique du récepteur qui pourrait alors, de ce fait, être recruté par des complexes existants soit dans le noyau soit dans le cytoplasme. Cette hypothèse pourrait rendre compte des cinétiques très différentes qui reposeraient sur un recrutement précoce au sein de complexes, les *foci*, reflétant la cinétique de phosphorylations et sur le phénomène beaucoup plus lent de la machinerie cellulaire aboutissant à la *trans*-activation.

Ce questionnement nous a poussé à réaliser une étude préliminaire de la phosphorylation du récepteur. Plusieurs inhibiteurs de kinases ont donc été sélectionnés et testés. Si un effet sur l'activité cellulaire a bien été observé pour les deux types de récepteurs, aucun effet concernant la localisation subcellulaire n'a pu être révélé. Ceci tend à démontrer que l'hypothèse précédente est fausse. Toutefois, il est trop tôt pour trancher définitivement tant que nous n'aurons pas pu démontrer de manière non équivoque que les inhibiteurs de kinases sont bien actifs sur les récepteurs.

Nous pensons avoir apporté des éléments nouveaux pour la compréhension du mécanisme d'action des récepteurs aux œstrogènes. Cela tient principalement aux options choisies qui associent des résultats *in vitro* et *in vivo* dans un contexte cellulaire unique qui nous permet de s'affranchir de nombreux facteurs de divergences. Notre démarche, bien qu'elle laisse certains résultats inexpliqués, pourra servir de base pour intégrer par la suite de nouveaux éléments qui trouveront leur place dans le puzzle des récepteurs nucléaires. Plus explicitement, ce cadre expérimental doit permettre de réduire autant que faire se peut les paradoxes apparents qui résultent de la comparaison trop rapides entre systèmes distincts. Nous démontrons en quoi les connaissances acquises *in vitro* peuvent être extrapolées pour *penser* le mécanisme cellulaire tel qu'il se déroule dans un contexte bien particulier. Cette synergie bien comprise entre facteurs cellulaires et moléculaires est pour nous un gage d'espoir pour la conception de nouvelles molécules anti-cancéreuses dont les effets pourront être anticipés car passés au crible des facettes multiples qui conditionnent *in fine* leur efficacité et leurs indésirables effets secondaires.

PERSPECTIVES

Notre étude devra s'étendre sur :

✓ Une étude analogue à celle menée devra réalisée avec l'isotype β du récepteur aux œstrogènes humain qui présente une structure et des propriétés biologiques distinctes de celles de l'isotype α .

✓ La caractérisation et le rôle des *foci* dans lesquels se retrouve le récepteur aux oestrogènes suite à une stimulation hormonale. La caractérisation de ces *foci* passe par, d'une part, la détermination des modifications post-traductionnelles dont le récepteur aux œstrogènes a été la cible et d'autre part, par la recherche de ses partenaires moléculaires.

Dans ce contexte, nous comprenons qu'il est donc important que nous connaissions l'état de phosphorylation des deux ER étudiés. L'étude préliminaire menée dans le cadre de cette thèse devra donc être complétée afin de déterminer plus précisément le rôle direct ou non des inhibiteurs de kinases dans la baisse de l'activité cellulaire observée et, d'identifier les sites phosphorylables du rtER_S.

✓ La dynamique des récepteurs aux œstrogènes dans la cellule pourra également être abordée par des expériences de FCS ou de FLIM. Ces expériences nous permettraient de caractériser les complexes transitoires dans lesquels les récepteurs aux oestrogènes se trouvent engagés. Des expériences de FCS seront également menées afin de déterminer les paramètres cinétiques d'association des multiples complexes formés suite à une stimulation hormonale.

✓ L'étude de la stabilité du rtER_S est essentielle pour appréhender les mécanismes moléculaires de ce récepteur. Ainsi, une étude *in vitro* des propriétés structurales et physico-chimiques est nécessaire. A cette fin, la purification de rtER_S devra être réalisée.

BIBLIOGRAPHIE

- Abul-Hajj, Y.J. et Cisek, P.L.** (1988) Catechol estrogen adducts. *J Steroid Biochem*, **31**, 107-110.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P. et Marino, M.** (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell*, **16**, 231-237.
- Agoff, S.N., Swanson, P.E., Linden, H., Hawes, S.E. et Lawton, T.J.** (2003) Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol*, **120**, 725-731.
- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M. et Chambon, P.** (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J*, **12**, 1153-1160.
- Altucci, L., Addeo, R., Cicatiello, L., Dauvois, S., Parker, M.G., Truss, M., Beato, M., Sica, V., Bresciani, F. et Weisz, A.** (1996) 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene*, **12**, 2315-2324.
- Anolik, J.H., Klinge, C.M., Hilf, R. et Bambara, R.A.** (1995) Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. *Biochemistry*, **34**, 2511-2520.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. et Meltzer, P.S.** (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **277**, 965-968.
- Arbuckle, N.D., Dauvois, S. et Parker, M.G.** (1992) Effects of antioestrogens on the DNA binding activity of oestrogen receptors in vitro. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3839-3844.
- Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H. et Notides, A.C.** (1994) Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, **8**, 1208-1214.
- Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H. et Notides, A.C.** (1995a) Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **55**, 163-172.
- Arnold, S.F., Obourn, J.D., Yudt, M.R., Carter, T.H. et Notides, A.C.** (1995b) In vivo and in vitro phosphorylation of the human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **52**, 159-171.
- Arnold, S.F., Vorojeikina, D.P. et Notides, A.C.** (1995c) Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J Biol Chem*, **270**, 30205-30212.
- Arnold, S.F., Melamed, M., Vorojeikina, D.P., Notides, A.C. et Sasson, S.** (1997) Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*, **11**, 48-53.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L. et Katzenellenbogen, B.S.** (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8517-8521.
- Ascenzi, P., Bocedi, A. et Marino, M.** (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor [alpha] and [beta]: Impact on human health. *Mol Aspects Med*, **27**, 299-402.
- Assikis, V.J., Neven, P., Jordan, V.C. et Vergote, I.** (1996) A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer*, **32A**, 1464-1476.

- Balasenthil, S., Barnes, C.J., Rayala, S.K. et Kumar, R.** (2004) Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett*, **567**, 243-247.
- Baniahmad, C., Nawaz, Z., Baniahmad, A., Gleeson, M.A., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W.** (1995) Enhancement of human estrogen receptor activity by SPT6: a potential coactivator. *Mol Endocrinol*, **9**, 34-43.
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. et Nilsson, S.** (1998) Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol*, **54**, 105-112.
- Batistuzzo de Medeiros, S.R., Krey, G., Hihi, A.K. et Wahli, W.** (1997) Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem*, **272**, 18250-18260.
- Batra, S.** (1986) Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract. *Eur J Pharmacol*, **127**, 37-42.
- Bellé, R., Le Bouffant, R., Morales, J., Cosson, B., Cormier, P. et Mulner-Lorillon, O.** (2007) L'embryon d'oursin, le point de surveillance de l'ADN endommagé de la division cellulaire et les mécanismes à l'origine de la cancérisation. *J Soc Biol*, **201**, 317-327.
- Belova, L., Delgado, B., Kocherginsky, M., Melhem, A., Olopade, O. et Conzen, S.** (2009) Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Tr*, **116**, 441-447.
- Benecke, A., Chambon, P. et Gronemeyer, H.** (2000) Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep*, **1**, 151-157.
- Beresford, N., Routledge, E.J., Harris, C.A. et Sumpter, J.P.** (2000) Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **162**, 22-33.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. et Ozato, K.** (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev*, **12**, 1638-1651.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D.** (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, **375**, 377-382.
- Bourguet, W., Germain, P. et Gronemeyer, H.** (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 381-388.
- Bouter, A.** (2003) Régulation du promoteur du gene vitellogénine chez la truite arc-en-ciel : Etude moléculaire et fonctionnelle de l'interaction entre le récepteur aux œstrogènes et des Eléments de Réponse aux œstrogènes. *Thèse de docteur de l'Université de Bretagne-Sud*.
- Bouter, A., Le Tilly, V. et Sire, O.** (2005) Interplay of flexibility and stability in the control of estrogen receptor activity. *Biochemistry*, **44**, 790-798.
- Bowler, J., Lilley, T.J., Pittam, J.D. et Wakeling, A.E.** (1989) Novel steroidal pure antiestrogens. *Steroids*, **54**, 71-99.
- Boyce-Derricott, J., Nagler, J.J. et Cloud, J.G.** (2009) Regulation of hepatic estrogen receptor isoform mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol*, **161**, 73-78.

- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. et Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
- Buisine, N. (2000) Evolution des gènes vitellogénine chez les salmonidés. *Thèse de docteur de l'Université de Rennes 1*.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J. et Picard, D. (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*, **15**, 2174-2183.
- Burke, L.J., Downes, M., Laudet, V. et Muscat, G.E. (1998) Identification and characterization of a novel corepressor interaction region in RVR and Rev-erbA alpha. *Mol Endocrinol*, **12**, 248-262.
- Burstein, E.A., Vedenkina, N.S. et Ivkova, M.N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem Photobiol*, **18**, 263-279.
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S. et Nakshatri, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*, **276**, 9817-9824.
- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A. et Berger, S.L. (1996) Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol*, **16**, 593-602.
- Candau, R., Zhou, J.X., Allis, C.D. et Berger, S.L. (1997) Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *EMBO J*, **16**, 555-565.
- Castano, E., Vorojeikina, D.P. et Notides, A.C. (1997) Phosphorylation of serine-167 on the human oestrogen receptor is important for oestrogen response element binding and transcriptional activation. *Biochem J*, **326** (Pt 1), 149-157.
- Castano, E., Chen, C.W., Vorojeikina, D.P. et Notides, A.C. (1998) The role of phosphorylation in human estrogen receptor function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**, 101-110.
- Celej, M.S., Montich, G.G. et Fidelio, G.D. (2003) Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Sci*, **12**, 1496-1506.
- Chaban, V.V., Lakhter, A.J. et Micevych, P. (2004) A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology*, **145**, 3788-3795.
- Chadli, A., Bouhouche, I., Sullivan, W., Stensgard, B., McMahon, N., Catelli, M.G. et Toft, D.O. (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12524-12529.
- Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P. et Baulieu, E.E. (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem*, **265**, 20686-20691.
- Chang, Y.T., Gray, N.S., Rosania, G.R., Sutherland, D.P., Kwon, S., Norman, T.C., Sarohia, R., Leost, M., Meijer, L. et Schultz, P.G. (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol*, **6**, 361-375.
- Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C. et Ali, S. (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*, **19**, 1002-1015.
- Chen, D., Huang, S.M. et Stallcup, M.R. (2000a) Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem*, **275**, 40810-40816.

- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M. et Ali, S.** (2000b) Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell*, **6**, 127-137.
- Chen, D., Washbrook, E., Sarwar, N., Bates, G.J., Pace, P.E., Thirunuvakkarasu, V., Taylor, J., Epstein, R.J., Fuller-Pace, F.V., Egly, J.M., et al.** (2002) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene*, **21**, 4921-4931.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. et Evans, R.M.** (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen, J.D. et Evans, R.M.** (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457.
- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R.A., Honore, B. et Smith, D.F.** (1996) Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *Mol Endocrinol*, **10**, 682-693.
- Chen, S. et Smith, D.F.** (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, **273**, 35194-35200.
- Chiba, H., Muramatsu, M., Nomoto, A. et Kato, H.** (1994) Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1815-1820.
- Cho, H. et Katzenellenbogen, B.S.** (1993) Synergistic activation of estrogen receptor-mediated transcription by estradiol and protein kinase activators. *Mol Endocrinol*, **7**, 441-452.
- Clark, D.E., Poteet-Smith, C.E., Smith, J.A. et Lannigan, D.A.** (2001) Rsk2 allosterically activates estrogen receptor alpha by docking to the hormone-binding domain. *EMBO J*, **20**, 3484-3494.
- Clarke, R.B., Anderson, E. et Howell, A.** (2004) Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 316-323.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Gerday, C. et Feller, G.** (2003) Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J Mol Biol*, **328**, 419-428.
- Conzen, S.D.** (2008) Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol*, **22**, 2215-2228.
- Couse, J.F. et Korach, K.S.** (1999) Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*, **60**, 143-148.
- Cowley, S.M. et Parker, M.G.** (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **69**, 165-175.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. et Lee, J.C.** (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*, **364**, 229-233.
- Cullen, K.J., Yee, D., Sly, W.S., Perdue, J., Hampton, B., Lippman, M.E. et Rosen, N.** (1990) Insulin-like growth factor receptor expression and function in human breast cancer. *Cancer Res*, **50**, 48-53.
- Curtis, S.W. et Korach, K.S.** (1991) Uterine estrogen receptor-DNA complexes: effects of different ERE sequences, ligands, and receptor forms. *Mol Endocrinol*, **5**, 959-966.
- Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F. et Korach, K.S.** (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor

- signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12626-12630.
- Dahlman-Wright, K., Baumann, H., McEwan, I.J., Almlöf, T., Wright, A.P., Gustafsson, J.A. et Hard, T.** (1995) Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1699-1703.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G. et Gustafsson, J.A.** (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 773-781.
- Dang, Z.C. et Lowik, C.W.** (2004) Differential effects of PD98059 and U0126 on osteogenesis and adipogenesis. *J Cell Biochem*, **92**, 525-533.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. et Parker, M.G.** (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*, **11**, 1025-1033.
- Danielsen, M., Hinck, L. et Ringold, G.M.** (1989) Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell*, **57**, 1131-1138.
- Dauvois, S., White, R. et Parker, M.G.** (1993) The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci*, **106 (Pt 4)**, 1377-1388.
- de Launoit, Y., Dauvois, S., Dufour, M., Simard, J. et Labrie, F.** (1991) Inhibition of cell cycle kinetics and proliferation by the androgen 5 alpha-dihydrotestosterone and antiestrogen N,n-butyl-N-methyl-11-[16' alpha-chloro-3',17 beta-dihydroxy-estra-1',3',5'-(10')triene-7' alpha-yl] undecanamide in human breast cancer ZR-75-1 cells. *Cancer Res*, **51**, 2797-2802.
- DeFranco, D.B.** (1999) Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem Biophys*, **30**, 1-24.
- Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K.S., Sonntag-Buck, V. et Gannon, F.** (2001) ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol*, **15**, 2064-2077.
- DeSilva, D.R., Jones, E.A., Favata, M.F., Jaffee, B.D., Magolda, R.L., Trzaskos, J.M. et Scherle, P.A.** (1998) Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol*, **160**, 4175-4181.
- Diel, P.** (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett*, **127**, 217-224.
- Dobrzycka, K.M., Townson, S.M., Jiang, S. et Oesterreich, S.** (2003) co-activators and co-repressors. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 517-536.
- Dodds, E.G.** (1938) Estrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature*, **141**, 247-249.
- Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A. et Sutherland, R.L.** (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 179-186.
- Dowers, T.S., Qin, Z.H., Thatcher, G.R. et Bolton, J.L.** (2006) Bioactivation of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol*, **19**, 1125-1137.
- Driscoll, M.D., Sathya, G., Muyan, M., Klinge, C.M., Hilf, R. et Bambara, R.A.** (1998) Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*, **273**, 29321-29330.

- Dukes, M., Miller, D., Wakeling, A.E. et Waterton, J.C. (1992) Antiuterotrophic effects of a pure antioestrogen, ICI 182,780: magnetic resonance imaging of the uterus in ovariectomized monkeys. *J Endocrinol*, **135**, 239-247.
- Dukes, M., Waterton, J.C. et Wakeling, A.E. (1993) Antiuterotrophic effects of the pure antioestrogen ICI 182,780 in adult female monkeys (*Macaca nemestrina*): quantitative magnetic resonance imaging. *J Endocrinol*, **138**, 203-210.
- Duncia, J.V., Santella, J.B., 3rd, Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., *et al.* (1998) MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett*, **8**, 2839-2844.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. et Chambon, P. (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J*, **13**, 5370-5382.
- Dutertre, M. et Smith, C.L. (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol*, **17**, 1296-1314.
- Dwivedy, I., Devanesan, P., Cremonesi, P., Rogan, E. et Cavalieri, E. (1992) Synthesis and characterization of estrogen 2,3- and 3,4-quinones. Comparison of DNA adducts formed by the quinones versus horseradish peroxidase-activated catechol estrogens. *Chem Res Toxicol*, **5**, 828-833.
- Egea, P.F., Klaholz, B.P. et Moras, D. (2000) Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett*, **476**, 62-67.
- Ellem, S.J. et Risbridger, G.P. (2007) Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. *Nat Rev Cancer*, **7**, 621-627.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S. et Kato, S. (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol Cell Biol*, **19**, 5363-5372.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. et Gustafsson, J.A. (1997) Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **82**, 4258-4265.
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailles, V. et Balaguer, P. (2006) Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor α or β . *Biochem Pharmacol*, **71**, 1459-1469.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. et Laudet, V. (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6803-6808.
- Evinger, A.J., 3rd et Levin, E.R. (2005) Requirements for estrogen receptor α membrane localization and function. *Steroids*, **70**, 361-363.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., *et al.* (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18623-18632.
- Fawell, S.E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M. et Parker, M.G. (1990) Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6883-6887.

- Filardo, E.J.** (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **80**, 231-238.
- Fillit, H., Weinreb, H., Cholst, I., Luine, V., McEwen, B., Amador, R. et Zabriskie, J.** (1986) Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. *Psychoneuroendocrinology*, **11**, 337-345.
- Flourirot, G., Pakdel, F. et Valotaire, Y.** (1996) Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, **124**, 173-183.
- Flourirot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y. et Valotaire, Y.** (1997) Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Mol Reprod Dev*, **48**, 317-323.
- Flourirot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V. et Gannon, F.** (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J*, **19**, 4688-4700.
- Folkman, J.** (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, **285**, 1182-1186.
- Foster, J.S. et Wimalasena, J.** (1996) Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **10**, 488-498.
- Freeman, B.C., Felts, S.J., Toft, D.O. et Yamamoto, K.R.** (2000) The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev*, **14**, 422-434.
- Gangloff, M.** (2000) Etude de l'agonisme et de l'antagonisme dans le récepteur alpha des hormones oestrogènes par mutagénèse dirigée et cristallographie. *Thèse*.
- Gao, X., Loggie, B.W. et Nawaz, Z.** (2002) The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. *Mol Cancer*, **1**, 7.
- Gebauer, M., Zeiner, M. et Gehring, U.** (1997) Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett*, **417**, 109-113.
- Georgakopoulos, T. et Thireos, G.** (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J*, **11**, 4145-4152.
- Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G.** (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, **14**, 121-141.
- Godl, K., Wissing, J., Kurtenbach, A., Habenberger, P., Blencke, S., Gutbrod, H., Salassidis, K., Stein-Gerlach, M., Missio, A., Cotten, M., et al.** (2003) An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15434-15439.
- Goldstein, S.R., Siddhanti, S., Ciaccia, A.V. et Plouffe, L., Jr.** (2000) A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update*, **6**, 212-224.
- Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D. et Notides, A.** (1968) Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Prog Horm Res*, **24**, 45-80.
- Graham, J.D., Yeates, C., Balleine, R.L., Harvey, S.S., Milliken, J.S., Bilous, A.M. et Clarke, C.L.** (1996) Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **56**, 93-98.
- Gray, N.S., Wodicka, L., Thunnissen, A.M., Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, F.H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., et al.** (1998) Exploiting chemical

- libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*, **281**, 533-538.
- Greene, G.L., Nolan, C., Engler, J.P. et Jensen, E.V.** (1980) Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5115-5119.
- Greenfield, N., Vijayanathan, V., Thomas, T.J., Gallo, M.A. et Thomas, T.** (2001) Increase in the stability and helical content of estrogen receptor alpha in the presence of the estrogen response element: analysis by circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, **40**, 6646-6652.
- Gregory, C.W., Johnson, R.T., Jr., Mohler, J.L., French, F.S. et Wilson, E.M.** (2001) Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res*, **61**, 2892-2898.
- Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Kruttsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., et al.** (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem*, **272**, 23843-23850.
- Grove, R.I. et Korach, K.S.** (1987) Estrogen stimulation of phosphatidylinositol metabolism in mouse uterine tissue. *Endocrinology*, **121**, 1083-1088.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P. et Milgrom, E.** (1996) The Ernst Schering Poster Award. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **56**, 3-9.
- Hager, G.L., Lim, C.S., Elbi, C. et Baumann, C.T.** (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **74**, 249-254.
- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C. et Brown, M.** (1994) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*, **264**, 1455-1458.
- Hall, J.M. et McDonnell, D.P.** (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, **140**, 5566-5578.
- Hall, J.M. et McDonnell, D.P.** (2005) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*, **5**, 343-357.
- Hammes, S.R.** (2003) The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2168-2170.
- Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, M.C. et Brown, M.** (1999) Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol*, **13**, 129-137.
- Hardin, C., Pommier, R., Calhoun, K., Muller, P., Jackson, T. et Pommier, S.** (2007) A new hormonal therapy for estrogen receptor-negative breast cancer. *World J Surg*, **31**, 1041-1046.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A. et Thomas, P.** (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10751-10756.
- Hawkins, M.B. et Thomas, P.** (2004) The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERbetaa are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology*, **145**, 2968-2977.
- Hedden, A., Muller, V. et Jensen, E.V.** (1995) A new interpretation of antiestrogen action. *Ann N Y Acad Sci*, **761**, 109-120.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. et Parker, M.G.** (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-736.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., *et al.* (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*, **87**, 905-931.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Paganini-Hill, A. et Mack, T.M. (1986) Estrogen use and cardiovascular disease. *Am J Obstet Gynecol*, **154**, 1181-1186.
- Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., *et al.* (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 3459-3467.
- Holm, C., Kok, M., Michalides, R., Fles, R., Koornstra, R.H., Wesseling, J., Hauptmann, M., Neefjes, J., Peterse, J.L., Stal, O., *et al.* (2009) Phosphorylation of the oestrogen receptor alpha at serine 305 and prediction of tamoxifen resistance in breast cancer. *J Pathol*, **217**, 372-379.
- Holzbeierlein, J., Lal, P., LaTulippe, E., Smith, A., Satagopan, J., Zhang, L., Ryan, C., Smith, S., Scher, H., Scardino, P., *et al.* (2004) Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol*, **164**, 217-227.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L. et Stallcup, M.R. (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4948-4952.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397-404.
- Horwitz, K.B., Costlow, M.E. et McGuire, W.L. (1975) MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, **26**, 785-795.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S. et Tung, L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*, **10**, 1167-1177.
- Howell, A., Osborne, C.K., Morris, C. et Wakeling, A.E. (2000) ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer*, **89**, 817-825.
- Htun, H., Holth, L.T., Walker, D., Davie, J.R. et Hager, G.L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell*, **10**, 471-486.
- Hu, X. et Lazar, M.A. (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, **402**, 93-96.
- Huang, Y., Huang, Y.L., Zhang, S., Zhu, Y.C. et Yao, T. (2004) Estradiol acutely attenuates glutamate-induced calcium overload in primarily cultured rat hippocampal neurons through a membrane receptor-dependent mechanism. *Brain Res*, **1026**, 254-260.
- Hutchison, K.A., Stancato, L.F., Owens-Grillo, J.K., Johnson, J.L., Krishna, P., Toft, D.O. et Pratt, W.B. (1995) The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J Biol Chem*, **270**, 18841-18847.
- Ignar-Trowbridge, D.M., Hughes, A.R., Putney, J.W., Jr., McLachlan, J.A. et Korach, K.S. (1991) Diethylstilbestrol stimulates persistent phosphatidylinositol lipid turnover by an estrogen receptor-mediated mechanism in immature mouse uterus. *Endocrinology*, **129**, 2423-2430.

- Ignar-Trowbridge, D.M., Teng, C.T., Ross, K.A., Parker, M.G., Korach, K.S. et McLachlan, J.A.** (1993) Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol Endocrinol*, **7**, 992-998.
- Ikeda, M., Kawaguchi, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Endo, T. et Onaya, T.** (1999) CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor coactivator-1 in thyroid hormone receptor-mediated transactivation. *Mol Cell Endocrinol*, **147**, 103-112.
- Imhof, M.O. et McDonnell, D.P.** (1996) Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, **16**, 2594-2605.
- Ing, N.H., Beekman, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W.** (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem*, **267**, 17617-17623.
- Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shiode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T. et Kato, S.** (2004) In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells*, **9**, 983-992.
- Jaber, B.M., Gao, T., Huang, L., Karmakar, S. et Smith, C.L.** (2006) The pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 promotes a novel interaction of estrogen receptor-alpha with the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein-binding protein/p300 coactivators. *Mol Endocrinol*, **20**, 2695-2710.
- Jablonski, A.** (1935) Weitere Versuche uber die negative Polarisierung der Phosphoreszenz. *Acta Physica Polonica*, **4**, 311-324.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. et Tora, L.** (1994) Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, **79**, 107-117.
- Janknecht, R. et Nordheim, A.** (1996) Regulation of the c-fos promoter by the ternary complex factor Sap-1a and its coactivator CBP. *Oncogene*, **12**, 1961-1969.
- Jensen, E.V. et Jacobson, H.I.** (1960) Fate of steroid estrogens in target tissues. In *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*, (Eds, Pincus, G. et Vollmer, E.P.). *Academic Press, New York*, 161-174.
- Jensen, E.V. et Jacobson, H.I.** (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Hormone Res*, **18**, 387-414.
- Jensen, E.V.** (1966) Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf*, **6**, 143-165.
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. et DeSombre, E.R.** (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **59**, 632-638.
- Jensen, E.V. et Khan, S.A.** (2004) A two-site model for antiestrogen action. *Mech Ageing Dev*, **125**, 679-682.
- Jisa, E., Dornstauder, E., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M. et Jungbauer, A.** (2001) Transcriptional activities of estrogen receptor alpha and beta in yeast properties of raloxifene. *Biochem Pharmacol*, **62**, 953-961.
- Joel, P.B., Traish, A.M. et Lannigan, D.A.** (1995) Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, **9**, 1041-1052.
- Joel, P.B., Smith, J., Sturgill, T.W., Fisher, T.L., Blenis, J. et Lannigan, D.A.** (1998a) pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol*, **18**, 1978-1984.

- Joel, P.B., Traish, A.M. et Lannigan, D.A.** (1998b) Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **273**, 13317-13323.
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D. et Toft, D.O.** (1998) Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem*, **273**, 3679-3686.
- Johnson, J., Corbisier, R., Stensgard, B. et Toft, D.** (1996) The involvement of p23, hsp90, and immunophilins in the assembly of progesterone receptor complexes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **56**, 31-37.
- Johnson, J.L. et Toft, D.O.** (1995) Binding of p23 and hsp90 during assembly with the progesterone receptor. *Mol Endocrinol*, **9**, 670-678.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., et al.** (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, **85**, 403-414.
- Kang, K.I., Devin, J., Cadepond, F., Jibard, N., Guiochon-Mantel, A., Baulieu, E.E. et Catelli, M.G.** (1994) In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 340-344.
- Kanis, J.A., Borgstrom, F., Johnell, O., Oden, A., Sykes, D. et Jonsson, B.** (2005) Cost-effectiveness of raloxifene in the UK: an economic evaluation based on the MORE study. *Osteoporos Int*, **16**, 15-25.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al.** (1995a) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270**, 1491-1494.
- Kato, S., Sasaki, H., Suzawa, M., Masushige, S., Tora, L., Chambon, P. et Gronemeyer, H.** (1995b) Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, **15**, 5858-5867.
- Katzenellenbogen, B.S. et Katzenellenbogen, J.A.** (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2**, 335-344.
- Kim, H.P., Lee, J.Y., Jeong, J.K., Bae, S.W., Lee, H.K. et Jo, I.** (1999) Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 257-262.
- Kim, K., Thu, N., Saville, B. et Safe, S.** (2003) Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **17**, 804-817.
- King, W.J. et Greene, G.L.** (1984) Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, **307**, 745-747.
- Kladde, M.P., Xu, M. et Simpson, R.T.** (1996) Direct study of DNA-protein interactions in repressed and active chromatin in living cells. *EMBO J*, **15**, 6290-6300.
- Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U. et Ryffel, G.U.** (1986) An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell*, **46**, 1053-1061.
- Klein-Hitpass, L., Kaling, M. et Ryffel, G.U.** (1988) Synergism of closely adjacent estrogen-responsive elements increases their regulatory potential. *J Mol Biol*, **201**, 537-544.
- Klinge, C.M., Peale, F.V., Jr., Hilf, R., Bambara, R.A. et Zain, S.** (1992) Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements in vitro. *Cancer Res*, **52**, 1073-1081.

- Klinge, C.M., Bodenner, D.L., Desai, D., Niles, R.M. et Traish, A.M.** (1997) Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1903-1912.
- Klinge, C.M.** (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*, **65**, 227-251.
- Klinge, C.M.** (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2905-2919.
- Knoblauch, R. et Garabedian, M.J.** (1999) Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol*, **19**, 3748-3759.
- Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y.T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J.F., et al.** (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol*, **7**, 411-422.
- Knockaert, M., Greengard, P. et Meijer, L.** (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 417-425.
- Koehler, K.F., Helguero, L.A., Haldosen, L.A., Warner, M. et Gustafsson, J.A.** (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev*, **26**, 465-478.
- Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D.F. et Koide, S.** (2007) Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. *Mol Endocrinol*, **21**, 829-842.
- Kojetin, D.J., Burris, T.P., Jensen, E.V. et Khan, S.A.** (2008) Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocr Relat Cancer*, **15**, 851-870.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G.** (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, **279**, 703-707.
- Koszewski, N.J. et Notides, A.C.** (1991) Phosphate-sensitive binding of the estrogen receptor to its response elements. *Mol Endocrinol*, **5**, 1129-1136.
- Kraus, W.L., Montano, M.M. et Katzenellenbogen, B.S.** (1994) Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol*, **8**, 952-969.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M. et Chambon, P.** (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J*, **5**, 891-897.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. et Gustafsson, J.** (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5925-5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. et Gustafsson, J.A.** (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- Kumar, R. et Thompson, E.B.** (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, **64**, 310-319.
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C.J., Sinha, N. et Nussinov, R.** (2000) Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts. *Protein Sci*, **9**, 10-19.
- Kuntz, M.A. et Shapiro, D.J.** (1997) Dimerizing the estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*, **272**, 27949-27956.

- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M. et Webb, P. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **74**, 311-317.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagree, V., Pellerin, I., Hubert, J.F., Tacnet, F., Le Caherec, F., Roudier, N., Thomas, D., Gouranton, J. et Deschamps, S. (1998) A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in *Xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem*, **273**, 12422-12426.
- Lannigan, D.A. (2003) Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, **68**, 1-9.
- Latonnelle, K., Fostier, A., Le Menn, F. et Bennetau-Pelissero, C. (2002) Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen Comp Endocrinol*, **129**, 69-79.
- Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, **19**, 207-226.
- Lazennec, G., Ediger, T.R., Petz, L.N., Nardulli, A.M. et Katzenellenbogen, B.S. (1997) Mechanistic aspects of estrogen receptor activation probed with constitutively active estrogen receptors: correlations with DNA and coregulator interactions and receptor conformational changes. *Mol Endocrinol*, **11**, 1375-1386.
- Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C. et Vignon, F. (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, **142**, 4120-4130.
- Le Breton, M., Belle, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. et Morales, J. (2003) M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 880-886.
- Le Douarin, B., vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M., Vivat, V., Gronemeyer, H., Losson, R. et Chambon, P. (1996) Ligand-dependent interaction of nuclear receptors with potential transcriptional intermediary factors (mediators). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**, 569-578.
- Le Drian, Y., Kern, L., Pakdel, F. et Valotaire, Y. (1995) Rainbow trout estrogen receptor presents an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, **109**, 27-35.
- Le Goff, P., Montano, M.M., Schodin, D.J. et Katzenellenbogen, B.S. (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem*, **269**, 4458-4466.
- Leanos-Castaneda, O. et Van Der Kraak, G. (2007) Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ERalpha and ERbeta, mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol*, **224**, 116-125.
- Lee, A.V. et Yee, D. (1995) Insulin-like growth factors and breast cancer. *Biomed Pharmacother*, **49**, 415-421.
- Lee, H. et Bai, W. (2002) Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **22**, 5835-5845.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y. et Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, **273**, 16651-16654.
- Lehrer, S.S. (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*, **10**, 3254-3263.

- Li, L., Haynes, M.P. et Bender, J.R.** (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4807-4812.
- Liehr, J.G.** (1990) Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res*, **238**, 269-276.
- Liehr, J.G. et Roy, D.** (1990) Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med*, **8**, 415-423.
- Lingham, R.B., Stancel, G.M. et Loose-Mitchell, D.S.** (1988) Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol*, **2**, 230-235.
- Liu, M.M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R.M., Price, R.H., Jr., Pestell, R.G. et Kushner, P.J.** (2002) Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, **277**, 24353-24360.
- Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M.V., Di Stasio, R., Ciociola, A., Bottero, D., Yamaguchi, H., Appella, E. et Auricchio, F.** (2008) Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J Cell Biol*, **182**, 327-340.
- Losel, R. et Wehling, M.** (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 46-56.
- Loven, M.A., Wood, J.R. et Nardulli, A.M.** (2001) Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol*, **181**, 151-163.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Luisi, B.F., Schwabe, J.W. et Freedman, L.P.** (1994) The steroid/nuclear receptors: from three-dimensional structure to complex function. *Vitam Horm*, **49**, 1-47.
- Ma, C.H., Dong, K.W. et Yu, K.L.** (2000) cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim Biophys Acta*, **1490**, 145-152.
- Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H. et Chambon, P.** (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature*, **338**, 271-274.
- Madigou, T., Le Goff, P., Salbert, G., Cravedi, J.P., Segner, H., Pakdel, F. et Valotaire, Y.** (2001) Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, **53**, 173-186.
- Maitre, J.L., Mercier, L., Dolo, L. et Valotaire, Y.** (1985) Characterization of specific receptors for estradiol, induction of vitellogenin and its mRNA in the liver of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Biochimie*, **67**, 215-225.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al.** (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- Margeat, E., Bourdoncle, A., Margueron, R., Poujol, N., Cavailles, V. et Royer, C.** (2003) Ligands differentially modulate the protein interactions of the human estrogen receptors alpha and beta. *J Mol Biol*, **326**, 77-92.
- Marino, M. et Ascenzi, P.** (2008) Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids*, **73**, 853-858.
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E. et Stoica, A.** (2000) A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **141**, 4503-4511.

- Martinez, E. et Wahli, W.** (1989) Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity. *EMBO J*, **8**, 3781-3791.
- Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley B, W. et Kato, S.** (2005) Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8126-8131.
- Matsuda, K., Ochiai, I., Nishi, M. et Kawata, M.** (2002) Colocalization and ligand-dependent discrete distribution of the estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta. *Mol Endocrinol*, **16**, 2215-2230.
- Matthews, J. et Gustafsson, J.A.** (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, **3**, 281-292.
- Matthews, J.B., Clemons, J.H. et Zacharewski, T.R.** (2001) Reciprocal mutagenesis between human alpha (L349, M528) and rainbow trout (M317, I496) estrogen receptor residues demonstrates their importance in ligand binding and gene expression at different temperatures. *Mol Cell Endocrinol*, **183**, 127-139.
- McEwen, B.S. et Alves, S.E.** (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, **20**, 279-307.
- McInerney, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S. et Katzenellenbogen, B.S.** (1998) Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology*, **139**, 4513-4522.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B. et O'Malley, B.W.** (1999a) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, **20**, 321-344.
- McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W.** (1999b) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **69**, 3-12.
- McMahon, C., Suthiphongchai, T., DiRenzo, J. et Ewen, M.E.** (1999) P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5382-5387.
- McPherson, S.J., Ellem, S.J., Simpson, E.R., Patchev, V., Fritzemeier, K.H. et Risbridger, G.P.** (2007) Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, **148**, 566-574.
- Medunjanin, S., Hermani, A., De Servi, B., Grisouard, J., Rincke, G. et Mayer, D.** (2005) Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem*, **280**, 33006-33014.
- Menasce, L.P., White, G.R., Harrison, C.J. et Boyle, J.M.** (1993) Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*, **17**, 263-265.
- Menuet, A., Anglade, I., Flouriot, G., Pakdel, F. et Kah, O.** (2001) Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout. *Biol Reprod*, **65**, 1548-1557.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O. et Pakdel, F.** (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod*, **66**, 1881-1892.
- Menuet, A., Le Page, Y., Torres, O., Kern, L., Kah, O. et Pakdel, F.** (2004) Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2. *J Mol Endocrinol*, **32**, 975-986.

- Metivier, R., Le Drian, Y., Salbert, G. et Pakdel, F.** (2000a) Interplay between liganded and orphan nuclear receptors controls reproductive pathways. *Biochem Cell Biol*, **78**, 345-358.
- Metivier, R., Petit, F.G., Valotaire, Y. et Pakdel, F.** (2000b) Function of N-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential alpha-helical structure and is negatively regulated by the A domain. *Mol Endocrinol*, **14**, 1849-1871.
- Metivier, R., Gay, F.A., Hubner, M.R., Flouriot, G., Salbert, G., Gannon, F., Kah, O. et Pakdel, F.** (2002) Formation of an hER alpha-COUP-TFI complex enhances hER alpha AF-1 through Ser118 phosphorylation by MAPK. *EMBO J*, **21**, 3443-3453.
- Michalides, R., Griekspoor, A., Balkenende, A., Verwoerd, D., Janssen, L., Jalink, K., Floore, A., Velds, A., van't Veer, L. et Neefjes, J.** (2004) Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell*, **5**, 597-605.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. et Auricchio, F.** (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*, **15**, 1292-1300.
- Miller, J.** (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York*.
- Moinfar, F., Okcu, M., Tsybrovskyy, O., Regitnig, P., Lax, S.F., Weybora, W., Ratschek, M., Tavassoli, F.A. et Denk, H.** (2003) Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer*, **98**, 703-711.
- Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A. et Katzenellenbogen, B.S.** (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*, **9**, 814-825.
- Moras, D. et Gronemeyer, H.** (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 384-391.
- Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K. et Schwartz, J.L.** (1992) A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, **131**, 1305-1312.
- Mosselman, S., Polman, J. et Dijkema, R.** (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, **392**, 49-53.
- Mouchel, N.** (1996) La vitellogénine chez la truite arc-en-ciel : Etude structurale comparée de la protéine et de son gène. Etude préliminaire de la régulation transcriptionnelle d'un gène vitellogénine. *Thèse de docteur de l'Université de Rennes 1*.
- Mukku, V.R. et Stancel, G.M.** (1985) Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J Biol Chem*, **260**, 9820-9824.
- Murdoch, F.E., Meier, D.A., Furlow, J.D., Grunwald, K.A. et Gorski, J.** (1990) Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent upon estradiol. *Biochemistry*, **29**, 8377-8385.
- Murphy, L.C., Weitsman, G.E., Skliris, G.P., Teh, E.M., Li, L., Peng, B., Davie, J.R., Ung, K., Niu, Y.L., Troup, S., et al.** (2006) Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **102**, 139-146.
- Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. et Lee, J.W.** (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.

- Nagler, J.J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D.G. et Rexroad, C., 3rd** (2007) The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ERalpha2 and both ERbeta isoforms. *Gene*, **392**, 164-173.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M. et Schwabe, J.W.** (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, **13**, 3209-3216.
- Nair, S.K., Thomas, T.J., Greenfield, N.J., Chen, A., He, H. et Thomas, T.** (2005) Conformational dynamics of estrogen receptors alpha and beta as revealed by intrinsic tryptophan fluorescence and circular dichroism. *J Mol Endocrinol*, **35**, 211-223.
- Nardulli, A.M. et Shapiro, D.J.** (1992) Binding of the estrogen receptor DNA-binding domain to the estrogen response element induces DNA bending. *Mol Cell Biol*, **12**, 2037-2042.
- Nardulli, A.M., Greene, G.L. et Shapiro, D.J.** (1993) Human estrogen receptor bound to an estrogen response element bends DNA. *Mol Endocrinol*, **7**, 331-340.
- Neuman, E., Ladha, M.H., Lin, N., Upton, T.M., Miller, S.J., DiRenzo, J., Pestell, R.G., Hinds, P.W., Dowdy, S.F., Brown, M., et al.** (1997) Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol*, **17**, 5338-5347.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. et Gustafsson, J.A.** (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, **81**, 1535-1565.
- Norfleet, A.M., Thomas, M.L., Gametchu, B. et Watson, C.S.** (1999) Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology*, **140**, 3805-3814.
- Norris, J.D., Fan, D., Kerner, S.A. et McDonnell, D.P.** (1997) Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, **11**, 747-754.
- NRC** (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, **97**, 161-163.
- Nutter, L.M., Wu, Y.Y., Ngo, E.O., Sierra, E.E., Gutierrez, P.L. et Abul-Hajj, Y.J.** (1994) An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol*, **7**, 23-28.
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K. et Hansen, U.** (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, **18**, 1859-1875.
- O'Lone, R., Knorr, K., Jaffe, I.Z., Schaffer, M.E., Martini, P.G., Karas, R.H., Bienkowska, J., Mendelsohn, M.E. et Hansen, U.** (2007) Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol*, **21**, 1281-1296.
- O'Malley, B.W.** (2005) A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol*, **19**, 1402-1411.
- O'Regan, R.M., Cisneros, A., England, G.M., MacGregor, J.I., Muenzner, H.D., Assikis, V.J., Bilimoria, M.M., Piette, M., Dragan, Y.P., Pitot, H.C., et al.** (1998) Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182,780 on endometrial cancer growth. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1552-1558.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S. et Pfaff, D.W.** (1998a) Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*, **139**, 5070-5081.

- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. et Muramatsu, M.** (1998b) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3505-3512.
- Oh, A.S., Lahusen, J.T., Chien, C.D., Fereshteh, M.P., Zhang, X., Dakshanamurthy, S., Xu, J., Kagan, B.L., Wellstein, A. et Riegel, A.T.** (2008) Tyrosine phosphorylation of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 is enhanced by Abl kinase and is required for its activity in cancer cells. *Mol Cell Biol*, **28**, 6580-6593.
- Oldenburg, R.A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C.J. et Devilee, P.** (2007) Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol*, **63**, 125-149.
- Orphanides, G. et Reinberg, D.** (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature*, **407**, 471-475.
- Osborne, C.K., Bardou, V., Hopp, T.A., Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Wong, J., Allred, D.C., Clark, G.M. et Schiff, R.** (2003) Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 353-361.
- Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H. et Pratt, W.B.** (1996) A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J Biol Chem*, **271**, 13468-13475.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J. et Scanlan, T.S.** (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, **277**, 1508-1510.
- Pakdel, F., Le Guellec, C., Vaillant, C., Le Roux, M.G. et Valotaire, Y.** (1989) Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. *Mol Endocrinol*, **3**, 44-51.
- Pakdel, F., Le Gac, F., Le Goff, P. et Valotaire, Y.** (1990) Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Mol Cell Endocrinol*, **71**, 195-204.
- Pakdel, F., Feon, S., Le Gac, F., Le Menn, F. et Valotaire, Y.** (1991) In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol Cell Endocrinol*, **75**, 205-212.
- Pakdel, F., Metivier, R., Flouriot, G. et Valotaire, Y.** (2000) Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology*, **141**, 571-580.
- Pappas, T.C., Gametchu, B. et Watson, C.S.** (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J*, **9**, 404-410.
- Park, K.J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y. et Gaynor, R.B.** (2005) Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell*, **18**, 71-82.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. et Pisani, P.** (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Parl, F.P.** (2000) Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer. *IOS Press, Amsterdam*
- Parsell, D.A., Taulien, J. et Lindquist, S.** (1993) The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **339**, 279-285; discussion 285-276.

- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerebatte, V., Cunha, G.R., Firestone, G.L. et Leitman, D.C.** (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Research*, **64**, 423-428.
- Pasqualini, C., Guivarc'h, D., Barnier, J.V., Guibert, B., Vincent, J.D. et Vernier, P.** (2001) Differential subcellular distribution and transcriptional activity of sigmaE3, sigmaE4, and sigmaE3-4 isoforms of the rat estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol*, **15**, 894-908.
- Peng, B., Lu, B., Leygue, E. et Murphy, L.C.** (2003) Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol*, **30**, 13-29.
- Penot, G., Le Peron, C., Merot, Y., Grimaud-Fanouillere, E., Ferriere, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Metivier, R., et al.** (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology*, **146**, 5474-5484.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G.** (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev*, **13**, 3198-3208.
- Peters, G.A. et Khan, S.A.** (1999) Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol*, **13**, 286-296.
- Petit, F., Valotaire, Y. et Pakdel, F.** (1995) Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **233**, 584-592.
- Petit, F.G., Metivier, R., Valotaire, Y. et Pakdel, F.** (1999) Synergism between a half-site and an imperfect estrogen-responsive element, and cooperation with COUP-TFI are required for estrogen receptor (ER) to achieve a maximal estrogen-stimulation of rainbow trout ER gene. *Eur J Biochem*, **259**, 385-395.
- Petit, F.G., Valotaire, Y. et Pakdel, F.** (2000) The analysis of chimeric human/rainbow trout estrogen receptors reveals amino acid residues outside of P- and D-boxes important for the transactivation function. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2634-2642.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G. et Gustafsson, J.A.** (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, **11**, 1486-1496.
- Pettersson, K., Delaunay, F. et Gustafsson, J.A.** (2000) Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*, **19**, 4970-4978.
- Pettersson, K. et Gustafsson, J.A.** (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, **63**, 165-192.
- Peyrat, J.P. et Bonnetterre, J.** (1992) Type 1 IGF receptor in human breast diseases. *Breast Cancer Res Treat*, **22**, 59-67.
- Pham, T.A., Hwung, Y.P., Santiso-Mere, D., McDonnell, D.P. et O'Malley, B.W.** (1992) Ligand-dependent and -independent function of the transactivation regions of the human estrogen receptor in yeast. *Mol Endocrinol*, **6**, 1043-1050.
- Picard, D. et Yamamoto, K.R.** (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, **6**, 3333-3340.
- Picard, D., Kumar, V., Chambon, P. et Yamamoto, K.R.** (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul*, **1**, 291-299.
- Pierrat, B., Heery, D.M., Chambon, P. et Losson, R.** (1994) A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human estrogen receptor functions as an efficient transactivation domain in yeast. *Gene*, **143**, 193-200.
- Pietras, R.J. et Szego, C.M.** (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, **265**, 69-72.

- Pietras, R.J. et Szego, C.M.** (1980) Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J*, **191**, 743-760.
- Pietras, R.J. et Marquez-Garban, D.C.** (2007) Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. *Clin Cancer Res*, **13**, 4672-4676.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.A. et Carlquist, M.** (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, **18**, 4608-4618.
- Ponglikitmongkol, M., White, J.H. et Chambon, P.** (1990) Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J*, **9**, 2221-2231.
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D. et Safe, S.** (1997) Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, **11**, 1569-1580.
- Pratt, W.B. et Toft, D.O.** (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **18**, 306-360.
- Pratt, W.B. et Toft, D.O.** (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 111-133.
- Qin, C., Singh, P. et Safe, S.** (1999) Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology*, **140**, 2501-2508.
- Rai, D., Frolova, A., Frasor, J., Carpenter, A.E. et Katzenellenbogen, B.S.** (2005) Distinctive actions of membrane-targeted versus nuclear localized estrogen receptors in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **19**, 1606-1617.
- Rayala, S.K., Talukder, A.H., Balasenthil, S., Tharakan, R., Barnes, C.J., Wang, R.A., Aldaz, M., Khan, S. et Kumar, R.** (2006) P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res*, **66**, 1694-1701.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G.L. et Levin, E.R.** (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol*, **18**, 2854-2865.
- Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J. et Muscat, G.E.** (2000) Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol Endocrinol*, **14**, 700-717.
- Renoir, J.M., Mester, J., Buchou, T., Catelli, M.G., Tuohimaa, P., Binart, N., Joab, I., Radanyi, C. et Baulieu, E.E.** (1984) Purification by affinity chromatography and immunological characterization of a 110kDa component of the chick oviduct progesterone receptor. *Biochem J*, **217**, 685-692.
- Richter, K. et Buchner, J.** (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*, **188**, 281-290.
- Robertson, J.F.** (2001) Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator--future possibilities in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 209-212.
- Robyr, D., Wolffe, A.P. et Wahli, W.** (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol*, **14**, 329-347.
- Roeder, R.G.** (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*, **16**, 402-408.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M. et Garabedian, M.J.** (1999) Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem*, **274**, 22296-22302.

- Rosania, G.R., Merlie, J., Jr., Gray, N., Chang, Y.T., Schultz, P.G. et Heald, R.** (1999) A cyclin-dependent kinase inhibitor inducing cancer cell differentiation: biochemical identification using *Xenopus* egg extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4797-4802.
- Rosen, N., Yee, D., Lippman, M.E., Paik, S. et Cullen, K.J.** (1991) Insulin-like growth factors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **18 Suppl 1**, S55-62.
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G. et Sumpter, J.P.** (2000) Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem*, **275**, 35986-35993.
- Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M. et Moras, D.** (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Research*, **2**, 353-359.
- Runnebaum, I.B. et Bruning, A.** (2005) Glucocorticoids inhibit cell death in ovarian cancer and up-regulate caspase inhibitor cIAP2. *Clin Cancer Res*, **11**, 6325-6332.
- Russell, K.S., Haynes, M.P., Sinha, D., Clerisme, E. et Bender, J.R.** (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5930-5935.
- Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J.D., Fitzpatrick, P.M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M.G. et Kushner, P.J.** (1995) Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol*, **15**, 1554-1563.
- Safe, S. et Kim, K.** (2008) Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, **41**, 263-275.
- Sanchez, R., Nguyen, D., Rocha, W., White, J.H. et Mader, S.** (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays*, **24**, 244-254.
- Saporita, A.J., Zhang, Q., Navai, N., Dincer, Z., Hahn, J., Cai, X. et Wang, Z.** (2003) Identification and Characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J Biol Chem*, **278**, 41998-42005.
- Sasson, S. et Notides, A.C.** (1983a) Estriol and estrone interaction with the estrogen receptor. II. Estriol and estrone-induced inhibition of the cooperative binding of [3H]estradiol to the estrogen receptor. *J Biol Chem*, **258**, 8118-8122.
- Sasson, S. et Notides, A.C.** (1983b) Estriol and estrone interaction with the estrogen receptor. I. Temperature-induced modulation of the cooperative binding of [3H]estriol and [3H]estrone to the estrogen receptor. *J Biol Chem*, **258**, 8113-8117.
- Sasson, S. et Notides, A.C.** (1984) Inability of [3H]estriol to induce maximal cooperativity of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem*, **20**, 1027-1032.
- Schlatter, L.K., Howard, K.J., Parker, M.G. et Distelhorst, C.W.** (1992) Comparison of the 90-kilodalton heat shock protein interaction with in vitro translated glucocorticoid and estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, **6**, 132-140.
- Schlegel, A., Wang, C., Pestell, R.G. et Lisanti, M.P.** (2001) Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J*, **359**, 203-210.
- Schmid, F.X.** (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 123-142.
- Schultis, T. et Metzger, J.W.** (2004) Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere*, **57**, 1649-1655.
- Schwabe, J.W., Neuhaus, D. et Rhodes, D.** (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature*, **348**, 458-461.
- Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T. et Rhodes, D.** (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **75**, 567-578.

- Schwartz, J.A., Zhong, L., Deighton-Collins, S., Zhao, C. et Skafar, D.F.** (2002) Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor- α alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J Biol Chem*, **277**, 13202-13209.
- Shah, Y.M. et Rowan, B.G.** (2005) The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (α) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol Endocrinol*, **19**, 732-748.
- Sheeler, C.Q., Singleton, D.W. et Khan, S.A.** (2003) Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr Res*, **29**, 237-255.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. et Greene, G.L.** (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Radek, J.T., Meyers, M.J., Nettles, K.W., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Agard, D.A. et Greene, G.L.** (2002) Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat Struct Biol*, **9**, 359-364.
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W. et Liao, J.K.** (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, **407**, 538-541.
- Singh, M., Setalo, G., Jr., Guan, X., Frail, D.E. et Toran-Allerand, C.D.** (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor- α knock-out mice. *J Neurosci*, **20**, 1694-1700.
- Skafar, D.F. et Notides, A.C.** (1985) Modulation of the estrogen receptor's affinity for DNA by estradiol. *J Biol Chem*, **260**, 12208-12213.
- Skafar, D.F. et Koide, S.** (2006) Understanding the human estrogen receptor- α using targeted mutagenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **246**, 83-90.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. et O'Malley, B.W.** (1997) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, **11**, 657-666.
- Smith, C.L. et O'Malley, B.W.** (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, **25**, 45-71.
- Smith, D.F. et Toft, D.O.** (1992) Composition, assembly and activation of the avian progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **41**, 201-207.
- Southcott, B.M.** (2001) Carcinoma of the endometrium. *Drugs*, **61**, 1395-1405.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., et al.** (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.
- Stefano, G.B., Prevot, V., Beauvillain, J.C., Fimiani, C., Welters, I., Cadet, P., Breton, C., Pestel, J., Salzert, M. et Bilfinger, T.V.** (1999) Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol*, **163**, 3758-3763.
- Stenoien, D.L., Mancini, M.G., Patel, K., Allegretto, E.A., Smith, C.L. et Mancini, M.A.** (2000a) Subnuclear trafficking of estrogen receptor- α and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol*, **14**, 518-534.
- Stenoien, D.L., Simeoni, S., Sharp, Z.D. et Mancini, M.A.** (2000b) Subnuclear dynamics and transcription factor function. *J Cell Biochem Suppl*, **Suppl 35**, 99-106.

- Stenoien, D.L., Patel, K., Mancini, M.G., Dutertre, M., Smith, C.L., O'Malley, B.W. et Mancini, M.A.** (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol*, **3**, 15-23.
- Stern et Volmer, M.** (1919) Extinction period of fluorescence. *Phys Z*, **20**, 183-193.
- Sterner, D.E. et Berger, S.L.** (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.
- Ström, A., Hartman, J., Foster, J.S., Keitz, S., Wimalasena, J. et Gustafsson, J.A.** (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17-beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1566-1571.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R. et Frail, D.E.** (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **273**, 27645-27653.
- Sumida, K., Ooe, N., Saito, K. et Kaneko, H.** (2003) Limited species differences in estrogen receptor alpha-mediated reporter gene transactivation by xenoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **84**, 33-40.
- Sun, M., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y.Y., Shelley, S.A., Nicosia, S.V. et Cheng, J.Q.** (2001) Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res*, **61**, 5985-5991.
- Takeshita, A., Yen, P.M., Misiti, S., Cardona, G.R., Liu, Y. et Chin, W.W.** (1996) Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, **137**, 3594-3597.
- Tang, K.E. et Dill, K.A.** (1998) Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. *J Biomol Struct Dyn*, **16**, 397-411.
- Taplin, M.E., Bubley, G.J., Ko, Y.J., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B. et Balk, S.P.** (1999) Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res*, **59**, 2511-2515.
- Taunton, J., Hassig, C.A. et Schreiber, S.L.** (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Tharakan, R., Lepont, P., Singleton, D., Kumar, R. et Khan, S.** (2008) Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Mol Cell Endocrinol*, **295**, 70-78.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J. et Dong, J.** (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, **146**, 624-632.
- Thomas, R.S., Sarwar, N., Phoenix, F., Coombes, R.C. et Ali, S.** (2008) Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J Mol Endocrinol*, **40**, 173-184.
- Thornton, J.W.** (2001) Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5671-5676.
- Toran-Allerand, C.D., Guan, X., MacLusky, N.J., Horvath, T.L., Diano, S., Singh, M., Connolly, E.S., Jr., Nethrapalli, I.S. et Tinnikov, A.A.** (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci*, **22**, 8391-8401.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G.** (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-684.

- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, C., Labrie, F. et Giguere, V.** (1998a) EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **139**, 111-118.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F. et Giguere, V.** (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell*, **3**, 513-519.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F. et Giguere, V.** (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, **11**, 353-365.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F. et Giguere, V.** (1998b) Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res*, **58**, 877-881.
- Trichet, V., Buisine, N., Mouchel, N., Moran, P., Pendas, A.M., Le Penne, J.P. et Wolff, J.** (2000) Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. *Mol Gen Genet*, **263**, 828-837.
- Trowbridge, J.M., Rogatsky, I. et Garabedian, M.J.** (1997) Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10132-10137.
- Tsai, C.J., Ma, B. et Nussinov, R.** (1999) Folding and binding cascades: shifts in energy landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9970-9972.
- Tsai, M.J. et O'Malley, B.W.** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, **63**, 451-486.
- Turner, C.H., Sato, M. et Bryant, H.U.** (1994) Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats. *Endocrinology*, **135**, 2001-2005.
- Tyulmenkov, V.V. et Klinge, C.M.** (2000) Interaction of tetrahydrocrysene ketone with estrogen receptors alpha and beta indicates conformational differences in the receptor subtypes. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 135-142.
- Vetillard, A. et Bailhache, T.** (2006) Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicol Sci*, **92**, 537-544.
- Vijayanathan, V., Greenfield, N.J., Thomas, T.J., Ivanova, M.M., Tyulmenkov, V.V., Klinge, C.M., Gallo, M.A. et Thomas, T.** (2007) Effects of estradiol and 4-hydroxytamoxifen on the conformation, thermal stability, and DNA recognition of estrogen receptor beta. *Biochem Cell Biol*, **85**, 1-10.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. et Gronemeyer, H.** (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J*, **17**, 507-519.
- Vohra, P.K., Puri, V. et Thomas, C.F.** (2003) Complementation and characterization of the *Pneumocystis carinii* MAPK, PCM. *FEBS Lett*, **551**, 139-146.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. et Losson, R.** (1996) Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J*, **15**, 110-124.
- vom Baur, E., Harbers, M., Um, S.J., Benecke, A., Chambon, P. et Losson, R.** (1998) The yeast Ada complex mediates the ligand-dependent activation function AF-2 of retinoid X and estrogen receptors. *Genes Dev*, **12**, 1278-1289.

- Wakeling, A.E., Dukes, M. et Bowler, J. (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*, **51**, 3867-3873.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., *et al.* (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7889-7893.
- Wang, R.A., Mazumdar, A., Vadlamudi, R.K. et Kumar, R. (2002) P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor- α and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J*, **21**, 5437-5447.
- Wang, Y., Chirgadze, N.Y., Briggs, S.L., Khan, S., Jensen, E.V. et Burris, T.P. (2006) A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9908-9911.
- Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A. et Muramatsu, M. (1997) Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 140-145.
- Watson, C.S., Campbell, C.H. et Gametchu, B. (1999) Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and xenoestrogens. *Exp Physiol*, **84**, 1013-1022.
- Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.M., Subramanian, S., McKinerney, E., *et al.* (1998) Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*, **12**, 1605-1618.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., *et al.* (1999) The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*, **13**, 1672-1685.
- Weber, G. et Shinitzky, M. (1970) Failure of Energy Transfer between Identical Aromatic Molecules on Excitation at the Long Wave Edge of the Absorption Spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **65**, 823-830.
- Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E.R., Warner, M. et Gustafsson, J.A. (2003) Update on estrogen signaling. *FEBS Lett*, **546**, 17-24.
- Weinberg, R.A. (1996) How cancer arises. *Sci Am*, **275**, 62-70.
- Weis, K.E., Ekena, K., Thomas, J.A., Lazennec, G. et Katzenellenbogen, B.S. (1996) Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol Endocrinol*, **10**, 1388-1398.
- Welshons, W.V., Lieberman, M.E. et Gorski, J. (1984) Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature*, **307**, 747-749.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. et Costas, M.A. (2000) RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett*, **485**, 195-199.
- White, R., Sjöberg, M., Kalkhoven, E. et Parker, M.G. (1997) Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J*, **16**, 1427-1435.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. et Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.
- Wittbrodt, J., Meyer, A. et Scharl, M. (1998) More genes in fish? *Bioessays*, **20**, 511-515.
- Wolffe, A.P., Wong, J. et Pruss, D. (1997) Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription. *Genes Cells*, **2**, 291-302.

- Wooge, C.H., Nilsson, G.M., Heierson, A., McDonnell, D.P. et Katzenellenbogen, B.S. (1992) Structural requirements for high affinity ligand binding by estrogen receptors: a comparative analysis of truncated and full length estrogen receptors expressed in bacteria, yeast, and mammalian cells. *Mol Endocrinol*, **6**, 861-869.
- Wu, R.C., Smith, C.L. et O'Malley, B.W. (2005) Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev*, **26**, 393-399.
- Wu, X., Li, H. et Chen, J.D. (2001) The human homologue of the yeast DNA repair and TFIIH regulator MMS19 is an AF-1-specific coactivator of estrogen receptor. *J Biol Chem*, **276**, 23962-23968.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. et Gronemeyer, H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*, **3**, 206.
- Xu, L., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.*, **9**, 140-147.
- Yang, J., Singleton, D.W., Shaughnessy, E.A. et Khan, S.A. (2008) The F-domain of estrogen receptor- α inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol*, **295**, 94-100.
- Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H. et Chambon, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J*, **11**, 3681-3694.
- Ylikomi, T., Wurtz, J.M., Syvala, H., Passinen, S., Pekki, A., Haverinen, M., Blauer, M., Tuohimaa, P. et Gronemeyer, H. (1998) Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **33**, 437-466.
- Yoshida, M., Nishi, M., Kizaki, Z., Sawada, T. et Kawata, M. (2002) Subcellular and subnuclear distributions of estrogen receptor α in living cells using green fluorescent protein and immunohistochemistry. *Acta Histochem Cytochem*, **34**, 413-422.
- Yoshinaga, S.K., Peterson, C.L., Herskowitz, I. et Yamamoto, K.R. (1992) Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science*, **258**, 1598-1604.
- Yudt, M.R., Vorojeikina, D., Zhong, L., Skafar, D.F., Sasson, S., Gasiewicz, T.A. et Notides, A.C. (1999) Function of estrogen receptor tyrosine 537 in hormone binding, DNA binding, and transactivation. *Biochemistry*, **38**, 14146-14156.
- Zamir, I., Zhang, J. et Lazar, M.A. (1997) Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, **11**, 835-846.
- Zargarian, L., Benleumi, M.S., Renisio, J.G., Merad, H., Maroun, R.G., Wieber, F., Mauffret, O., Porumb, H., Troalen, F. et Fermandjian, S. (2003) Strategy to discriminate between high and low affinity bindings of human immunodeficiency virus, type 1 integrase to viral DNA. *J Biol Chem*, **278**, 19966-19973.
- Zhang, Q.X., Borg, A., Wolf, D.M., Oesterreich, S. et Fuqua, S.A. (1997) An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res*, **57**, 1244-1249.
- Zheng, F.F., Wu, R.C., Smith, C.L. et O'Malley, B.W. (2005) Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol*, **25**, 8273-8284.
- Zhu, B.T., Han, G.Z., Shim, J.Y., Wen, Y. et Jiang, X.R. (2008) Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor α and β subtypes: insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology*, **147**, 4132-4150.

- Zhu, Y., Bond, J. et Thomas, P.** (2003a) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2237-2242.
- Zhu, Y., Rice, C.D., Pang, Y., Pace, M. et Thomas, P.** (2003b) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2231-2236.
- Zwijsen, R.M., Wientjens, E., Klompmaker, R., van der Sman, J., Bernards, R. et Michalides, R.J.** (1997) CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*, **88**, 405-415.
- Zwijsen, R.M., Buckle, R.S., Hijmans, E.M., Loomans, C.J. et Bernards, R.** (1998) Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev*, **12**, 3488-3498.

ANNEXES

I. Corégulateurs de ER chez *S. cerevisiae*

Tableau 17 : Liste des corégulateurs interagissant avec le récepteur aux œstrogènes chez *S. cerevisiae* et leurs analogues chez l'homme.

Corégulateurs chez <i>S. cerevisiae</i>	Analogues chez l'humain	Références
SWI/SNF (<i>SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>)	hSNF2 (α et β), BRG1p (<i>Brahma-Related Gene 1 protein</i>)	(Yoshinaga <i>et al.</i> , 1992; Chiba <i>et al.</i> , 1994)
SIN3/RPD3 (Switch INdépendant 3 / Reduced Potassium Dependency 3)	Sin3A Sin3B	(Taunton <i>et al.</i> , 1996; Wolffe <i>et al.</i> , 1997)
Complexe SAGA contenant GCN5 (<i>Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase</i>)	Complexe P/CAF / GCN5 (<i>CBP/p300-Associated Factor</i>)	(Georgakopoulos et Thireos, 1992; Candau <i>et al.</i> , 1996; Candau <i>et al.</i> , 1997; vom Baur <i>et al.</i> , 1998; Sterner et Berger, 2000)
SPT6 (<i>SuPressor of Ty 6</i>)		(Baniahmad <i>et al.</i> , 1995)
RTP6 (=SUG1) (<i>Regulatory Particle Triphosphate</i>)	TRIP1 (<i>Thyroid Receptor Interacting Protein 1</i>)	(vom Baur <i>et al.</i> , 1996)
RSP5 (<i>Reverses Spt-Phenotype 5</i>)	RPF1 (<i>Receptor Potentiating Factor-1</i>)	(Imhof et McDonnell, 1996; Gao <i>et al.</i> , 2002; Hall et McDonnell, 2005)

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Souche de levure

Les levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées pour cette étude proviennent de la souche W303.1B (α , *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2-1*, *can^R*, *cyr+*).

II.1.2 Vecteurs plasmidiques

II.1.2.1 Vecteurs d'expression

pY60er

Ce vecteur d'expression (Figure 33) est dérivé du vecteur pYeDP60-AQPcic (Lagree *et al.*, 1998) dont l'ADNc codant pour l'aquaporine a été remplacé, entre les sites *EcoRI* et *SacI*, par l'ADNc de hER α et rtER_S provenant respectivement des plasmides YEPE15 et pCMV5/rtER_S. Une étape intermédiaire impliquant le vecteur pBBR1-MCS2 a été nécessaire.

Ce vecteur pY60er contient un promoteur de levure (*pGal*) et un terminateur phosphoglycérate kinase de levure (*tPGK*) organisés en tandem. Ces éléments sont séparés par les sites uniques de restriction *SacI* et *EcoRI*, entre lesquels est cloné le gène codant pour hER α ou rtER_S. Ce promoteur permet, en présence de galactose, une forte expression des gènes positionnés en aval, alors que cette expression est réprimée par le glucose. Les marqueurs de sélection sont respectivement un gène de résistance à l'ampicilline et un gène conférant la prototrophie pour l'uracile pour *E. coli* et *S. cerevisiae* (Lagree *et al.*, 1998).

pY60GFP_{er}

Afin de construire les plasmides d'expression des récepteurs aux œstrogènes fusionnés à la GFP, les ADNc de hER α et rtER_S ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides YEPE15 et pCMV5/rtER_S et sous-clonés (entre les sites *EcoRI* et *SacI*) dans un plasmide dérivé de pBluescript SK phagemide. Ces vecteurs ainsi obtenus sont nommés pBKher α et pBKrters_S. Ensuite, l'ADNc de GFP est amplifié par PCR à partir du vecteur pEGFP-N1 puis sous-cloné dans les plasmides pBKher α et pBKrters_S (entre les sites *EcoRI* et *BamHI*). Le site de restriction *BamHI* est unique car introduit par l'amorce « sens » utilisée pour

l'amplification des gènes *her α* et *rter_s*. L'amorce « reverse » utilisée pour l'amplification de *gfp*, contient une mutation du codon stop (TAA en GGA) afin de permettre la transcription de la protéine recombinante entière. Les plasmides obtenus, pBKGFPh α et pBKGFPrter_s sont fusionnés au plasmide pYeDP60-AQPcic (site *SacI*) (Lagree *et al.*, 1998). Les plasmides présentant une fusion correcte sont alors digérés par *EcoRI* puis ligaturés afin d'obtenir les vecteurs pY60GFPh α et pY60GFPrter_s (Figure 33).

II.1.2.2 Vecteurs rapporteurs

YRPE2

Ce plasmide rapporteur (Figure 33), don du Pr. O'Malley (Houston, USA), contient les éléments minimum du promoteur du gène codant pour l'iso-1-cytochrome C de levure (*CYC*) en amont du gène *lacZ*. Ce gène *lacZ* code pour la β -galactosidase d'*E. coli*. Un tandem de deux séquences consensus d'ERE séparés de 20 pb (ERE_{cs} ; AGGTCAcagTGACCT) précède ces séquences fusionnées *CYC-lacZ*. Ce vecteur possède deux marqueurs de sélection conférant aux bactéries hôtes la résistance à l'ampicilline et aux levures la prototrophie pour la leucine. Ce vecteur est du type réplcatif dans la levure.

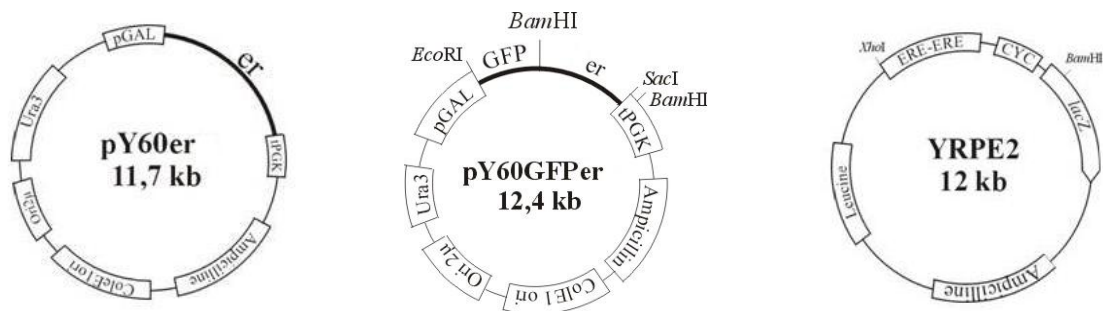


Figure 33 : Vecteurs d'expression pY60 et vecteur rapporteur YRPE2.

pGal : promoteur inductible par le galactose. GFP : gène codant pour la GFP. *er* : gène codant pour *her α* ou *rter_s*. tPGK : terminateur du gène de la phospho-gluco-kinase. Ampicilline : gène de résistance. ColE1 ori : origine de réplcation bactérienne. Ori 2 μ : origine de réplcation de levure. Ura3 : gène conférant l'auxotrophie pour l'uracile.

ERE-ERE : tandem de deux séquences consensus. *CYC* : promoteur du cytochrome C. *lacZ* : gène rapporteur codant pour la β -galactosidase. Leucine : gène conférant l'auxotrophie pour la leucine

Y_{EREcs}, Y_{-210/-130} et Y_{-450/-310}

Y_{EREcs} diffère du plasmide précédemment décrit (YRPE2) par la présence d'un seul ERE consensus en amont du promoteur CYC.

Y_{-210/-130} et Y_{-450/-310} ne contiennent pas de séquence ERE_{cs} mais une séquence ERE potentielle du gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel (pERE₁ ou pERE₂). L'insertion de pERE₂ (position -180 pb du site d'initiation de la transcription (+1)) conduit au plasmide Y_{-210/-130} alors que celle de pERE₁ (position -430 pb du +1) est introduit dans plasmide Y_{-450/-310} (Figure 34).

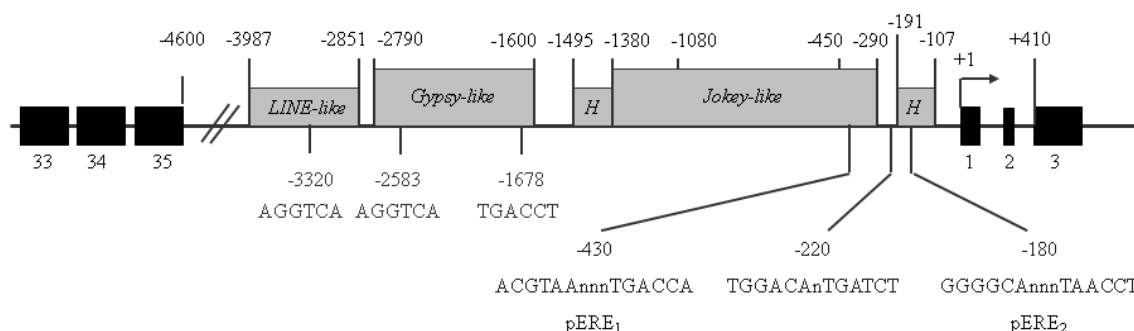


Figure 34 : Organisation de la région intergénique séparant les gènes codant pour la vitellogénine de la truite arc-en-ciel.

Les deux gènes codant pour la vitellogénine de la truite arc-en-ciel (*rtvtg*) arrangés en tandem sont représentés par les derniers exons (exons 33 à 35) pour le gène en amont et par les premiers exons (exons 1 à 3) pour le gène en aval. Les exons sont représentés par les rectangles pleins noirs. Les bases de la région intergénique (4,6 kb) sont numérotées à partir du site d'initiation de la transcription (+1) du second gène *rtvtg*. Les rectangles grisés représentent deux rétrotransposons : *Gypsy-like* et *Jockey-like*, et deux courtes séquences (*H*) homologues au gène codant pour des glycoprotéines de l'enveloppe du HIV. La séquence ainsi que la position (par rapport au site +1) des trois ERE potentiels sont représentés sur la figure.

II.1.3 Solutions

II.1.3.1 Etude in vivo

La composition des solutions salines et celle des milieux de culture sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Solutions salines et milieux de culture.

Transformations des souches
TE 10X : Tris HCl 100mM (pH 7,5), EDTA 10mM LiAc 10X : Acétate de lithium 1M (pH 7,5, ajusté avec de l'acide acétique), Autoclavage PEG 8000 50% : 25 g dissout dans 25 g d'eau désionisée, autoclavage
Stocks d'hormones
E2 10⁻²M : 27,2mg de 17 β -œstradiol (Sigma) dissout dans 10mL d'éthanol DES 10⁻²M : 26,8mg de diéthylstilbestrol (Sigma) dissout dans 10mL d'éthanol 4-OHT 10⁻²M : 38,8mg de 4-hydroxytamoxifène (Sigma) dissout dans 10mL d'éthanol Ral 10⁻²M : 51mg de raloxifène (Sigma) dissout dans 10mL de DMSO ICI 10⁻²M : 60,7mg d'ICI 182 780 (Sigma) dissout dans 10mL de DMSO Toutes les solutions d'hormone de concentration variant de 10 ⁻³ à 10 ⁻⁷ M sont préparées en diluant les solutions mères à 10 ⁻² M dans le solvant approprié.
Mesure des activités β -galactosidase
Gal 10X : 50g de galactose (Carlo Erba) dissout dans 200mL d'eau désionisée, stérilisation sur filtre (0,22 μ m) Tampon Z : Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 60mM, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 40mM, KCl 10mM, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1mM, β -mercaptoéthanol 50mM, pH7, autoclavage ONPG : dissout à 4mg/mL dans le tampon Z Ac/Tol 9 : 1 : 9 volumes d'acétone pour 1 volume de toluène
Inhibiteurs de kinases
Aminopurvalanol A : (Merck) dilué à 5.10 ⁻² M dans du DMSO SB 203580 : (Merck) dilué à 5.10 ⁻² M dans du DMSO U0126 : (Merck) dilué à 5.10 ⁻² M dans du DMSO
Lyse des cellules
Réactif de Pierce + inhibiteur de protéase : 1 comprimé d'inhibiteurs de protéases (Complete mini, protease inhibitor cocktail tablets, Roche) dissout dans 10mL de réactif Y-PER (Yeast Protein Extraction Reagent, Pierce)
Dosage des protéines
SDS 0,1% : 100mg (Sigma) dissout dans 100mL d'eau désionisée BSA 200μg/mL : 2mg de sérum albumine bovine (Sigma) dissout dans 10 mL d'eau désionisée Réactif A : 1g de Na ₂ CO ₃ (Carlo Erba) dissout dans 50mL de NaOH 0,1M Réactif B : CuSO ₄ ·5H ₂ O 5mg/mL (Carlo Erba), tartrate sodium potassium 10mg/mL (Carlo Erba) Réactif C : réactif A + réactif B (50 : 1) Réactif de Folin : le réactif de Folin-Ciocalteu (Panreac) est dilué au ½ dans de l'eau désionisée
SDS-PAGE
Acrylamide/bisacrylamide (29:1) à 40 % (Interchim) Tampon du gel de résolution (4X) : SDS 0,4 %, Tris 1,5M (pH 8,8) Tampon du gel de concentration (4X) : SDS 0,4%, Tris 0,5 M (pH 6,8) Tampon réservoir (5X) : Tris 125mM, glycine 1,25M (pH 8,3), SDS 0,5% APS : Persulfate d'ammonium 10% (Sigma) TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (Avocado) Tampon Laemmli (5X) : Tris 250mM (pH6,8), SDS 10%, glycérol 50%, β -mercaptoéthanol 15%, bleu de bromophénol 0,5% Solution de coloration : 0,25g de bleu de Coomassie R250 (Sigma) dilué dans un mélange éthanol/eau/acide acétique (45 : 45 : 10) Solution de décoloration : éthanol, acide acétique, eau (50:10:40) Marqueur de taille : Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) Marqueur de taille coloré : PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)
Western-Blot
Tampon de transfert : Tris 50mM, glycine 190mM, méthanol 10% (pH 8,6 \pm 0,2) Membrane de nitrocellulose : Hybond ECL, 0,45 μ M (GE Healthcare) TBS : Tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, pH 8 Rouge Ponceau (Sigma) TBST 0,1% : 0,1% de Tween 20 dilué dans du TBS TBST 0,05% : 0,05% de Tween 20 dilué dans du TBS TBST 0,1%/lait 5% : TBST 0,1% contenant 5% de lait écrémé TBST 0,05%/lait 5% : TBST 0,05% contenant 5% de lait écrémé

Bain anticorps primaire et secondaire: TBS contenant 2% de lait écrémé

Anticorps primaire anti-GFP : Anti-GFP rabbit polyclonal serum (Invitrogen) dilué 1000 fois dans TBS lait 2%

Anticorps primaire anti-hER α : Anti-Estrogen receptor clone SP1 (Lab Vision) dilué 1000 fois dans TBS lait 2%

Anticorps secondaire : Rabbit IgG HRP-linked whole Ab, Donkey (GE Healthcare) dilué 1000 fois dans TBS lait 2%

Réactif chimio-luminescent : 3mL de « Peroxide solution » + 3mL de « Luminol/Enhancer solution » par membrane de nitrocellulose (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific)

Révélateur et Fixateur pour autoradiographie (Sigma)

Film autoradiographique : Classic Blue Autoradiography BX (Midsco)

Milieus de culture

YPD : tryptone 20g/L (Grosseron), extrait autolytique de levure 10g/L (Grosseron), glucose 20g/L (Carlo Erba), pH 5,8, autoclave

YPRE : tryptone 20g/L (Grosseron), extrait autolytique de levure 10g/L (Grosseron), raffinose 5g/L (Alpha Aesar), pH 7, autoclave, éthanol 3%

SD: Yeast nitrogen base sans acides aminés 6,7 g/L (Sigma), glucose 20 g/L (Carlo Erba) pH 5,8. La solution de complément drop-out (Sigma), contenant un mélange spécifique d'acides aminés et de nucléosides selon la sélection recherchée (DO/-Leu, DO/-Ura, DO/-Leu/-Ura), est stérilisée par filtration sur membrane (0,22 μ m) et ajoutée au milieu minimum de culture après autoclavage de ce dernier.

Microscopie confocale

PBS : NaCl 8g, KCl 0,2g, Na₂HPO₄ 1,44g, KH₂PO₄ 0,24g, pH 7,4, autoclavage

FPM4-64 : FluoroProbes Membrane Marker 4-64 (Fluoroprobes)

DRAQ-5 (Biostatus, UK)

II.1.3.2 Etude *in vitro*

Solutions salines :

Toutes nos expériences menées *in vitro* ont été réalisées avec le même tampon d'étude dont la composition est : Tris-HCl 10mM (pH 7,5), EDTA 0,1mM (Sigma), DTT 1mM (Carlo Erba), glycérol anhydre 10% (Sigma). Une partie de nos travaux a consisté à étudier l'effet de la concentration en chlorure de potassium sur les propriétés physico-chimiques du récepteur aux œstrogènes humain. Pour cela, nous avons utilisé des concentrations variables en KCl : 80, 140 et 200mM.

Les solutions d'acrylamide nécessaires pour les mesures d'atténuation de fluorescence ont été obtenues en dissolvant l'acrylamide (Sigma) dans le tampon d'étude de façon à ce que la concentration finale en acrylamide soit de 2M.

Les solutions d'œstrogènes et d'anti-œstrogènes (10^{-7} M) sont préparées à partir d'une solution mère à 10^{-2} M dans de l'éthanol (E2, DES et 4-OHT) ou dans du DMSO (Ral et ICI).

Solutions biologiques :

Oligonucléotides fluorescéinés

Les solutions d'oligonucléotide double brins ont été préparées à partir de deux séquences complémentaires de 21 bases. Ces séquences ont été synthétisées, purifiées et ajustées à une concentration de 100 μM par la société Proligo (Paris, France). Seul un des brins de chaque oligonucléotide double brins est marqué à la fluorescéine à l'extrémité 5'. Les différentes séquences utilisées sont présentées dans le Tableau 19.

Les solutions d'oligonucléotide double brins ont été préparées comme suit:

1. chaque solution commercialisée d'oligonucléotide simple brin a été diluée, dans le tampon d'étude contenant 80mM de KCl, pour obtenir une concentration finale de 1 μM ,
2. la solution d'oligonucléotide, contenant la même quantité des deux oligonucléotides simple brin complémentaires, a été chauffée à 85°C pendant 10 minutes puis refroidie lentement jusqu'à 4°C.

Tableau 19 : Oligonucléotides fluorescéinés utilisés pour les mesures d'anisotropie de fluorescence.

Les séquences ERE consensus ou imparfaites sont soulignées.

Nom des oligonucléotides	Séquence
ERE _{cs}	GTCAGGTCACAGTGACCTGAT
rtvtgERE	AGTGGGGCAGGTTAACCTAAC
OLIns	CCCACGTAAACTGACCATCC

Récepteurs aux œstrogènes humains

Les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes humain (hER α et hER β) sont exprimés chez baculovirus, purifiés et commercialisés par Pan Vera Corporation (Madison, Wisconsin, USA). La concentration de ces récepteurs est de 2,6 μM pour hER α et 4,5 μM pour hER β . Avant toute expérience, le récepteur est dilué de façon à obtenir une concentration de $7,5 \cdot 10^{-7}$ M dans le tampon d'étude une heure minimum avant le début de l'expérience et conservé dans la glace tout au long de celle-ci. Toutes les expériences, mis à part l'étude sur la stabilité thermique du hER, ont été effectuées à 10°C.

II.2 Méthodes

II.2.1 Etude *in vivo*

II.2.1.1 Transformation de *S. cerevisiae* par un vecteur d'expression et un vecteur rapporteur

Les levures *S. cerevisiae* W303.1B sont transformées par la méthode chimique utilisant l'acétate de lithium (Yeast Protocols Handbook, Clontech). Pour la transformation, une quantité de plasmides 5 fois plus importante a été utilisée comparée à celle proposée par Clontech, soit 0,5 µg. Deux transformations consécutives ont été réalisées : dans un premier temps, les levures W303.1B sont transformées par le vecteur d'expression pY60er et isolées sur un milieu sélectif SD/-Ura. Dans un second temps ces levures sont co-transformées par un des vecteurs rapporteurs contenant 1 ou 2 séquences ERE consensus ou des combinaisons d'ERE potentiels dans la région intergénique du gène vitellogénine de la truite arc-en-ciel, et isolées sur un milieu sélectif SD/-Ura/-Leu. Les vecteurs YRPE2 et pY60er ont également été introduits, seuls, chez *S. cerevisiae* W303.1B.

II.2.1.2 Dosage de *trans*-activation du récepteur aux œstrogènes

Principe :

La capacité du récepteur aux œstrogènes à activer un gène est étudiée *in vivo* (Figure 35). A cette fin, deux plasmides ont été introduit dans *S. cerevisiae* : un vecteur d'expression pY60(GFP)er et un vecteur rapporteur YRPE2 (Figure 4). L'ajout de galactose dans le milieu de culture de levures induit l'expression de ER. Celui-ci peut alors se dimériser et se fixer sur les séquences ERE et ainsi activer la transcription du gène *lacZ*. Le simple dosage d'activité de la β-galactosidase permet donc de quantifier les phénomènes d'expression du récepteur aux œstrogènes, de sa fixation sur les ERE et de *trans*-activation.

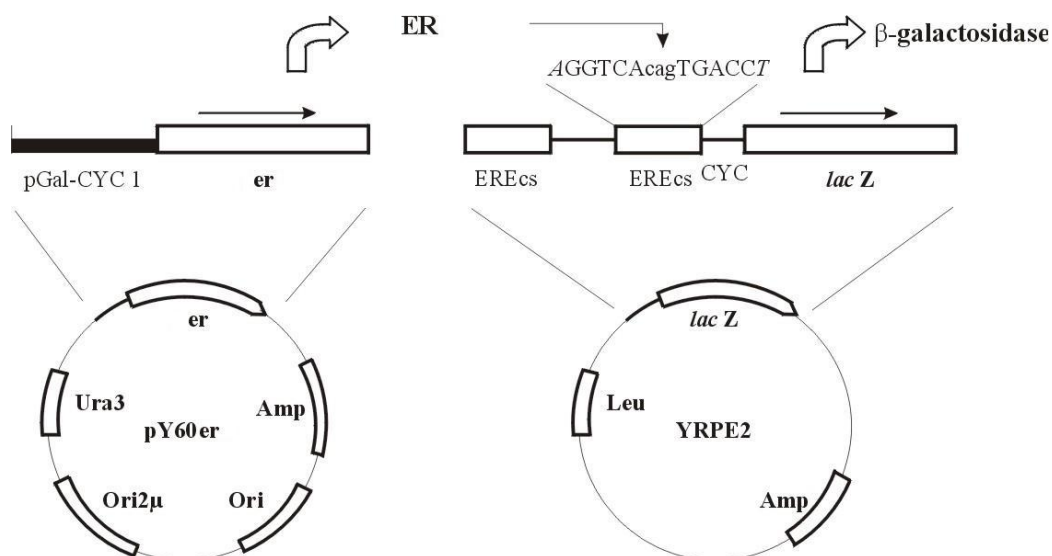


Figure 35 : Principe de la mesure de *trans*-activation du gène *lacZ* par le ER chez *S. cerevisiae*.

Dans le vecteur d'expression, pY60, a été préalablement cloné la partie codante du hER α ou du rER γ en aval d'un promoteur pGal-CYC, inducible par le galactose. Le vecteur rapporteur YRPE2, quant à lui, possède un gène *lacZ* en aval de 2 séquences ERE consensus et d'une région CYC contenant les éléments de base du promoteur du cytochrome C.

Mode opératoire :

Un clone de levures co-transformées est inoculé dans 25mL de milieu sélectif approprié puis incubé à 30°C sous agitation (150 tpm) pendant environ 17 h. Cette pré-culture ($DO_{600nm, l=1cm}$ de l'ordre de 1) est diluée dans le milieu YPRE (Tableau 18) de façon à obtenir une $DO_{600nm, l=1cm} \approx 0,1$. Dès que cette culture, incubée à 30°C sous agitation, atteint une $DO_{600nm, l=1cm}$ comprise entre 0,4 et 0,6 (début de la phase exponentielle de croissance, 9 h), l'induction par le galactose (20 g/L) et la stimulation hormonale (la solution hormonale ajoutée est 100 fois concentrée) sont réalisées. Après 17 h d'induction et de stimulation hormonale, le culot d'1mL de culture, obtenu par centrifugation (13000 tpm, 30sec), est repris dans 1mL de tampon Z. Un aliquote de la suspension cellulaire, dilué au $1/20^{ème}$ (50 μ L), est prélevé pour la mesure d'absorbance à 600nm. Parallèlement, l'activité β -galactosidase est mesurée sur un même aliquote (50 μ L) dilué au $1/20^{ème}$ dans du tampon Z et perméabilisé par ajout de 50 μ L d'un mélange acétone-toluène (9 : 1). Les échantillons sont pré-incubés 15 min à 30°C avant l'ajout de 200 μ L d'o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (4mg/mL). Dès qu'une coloration jaune apparaît, la réaction est stoppée par 0,5mL de Na₂CO₃ à 1M. Les extraits cellulaires sont centrifugés (1500g, 15 min) et la densité optique du surnageant est mesurée à 420 nm. A cette longueur d'onde nous mesurons les quantités de produit libéré, l'o-

nitrophénol (ONP), par hydrolyse de l'ONPG. L'activité β -galactosidase (Unité Miller, U.M.) est déterminée par la formule suivante (Miller, 1972) : $\frac{1000 \times DO_{420nm, l=1cm}}{t \times v \times DO_{600nm, l=1cm}}$ où t est le temps de la réaction (en min) à 30°C et v, le volume de culture utilisé pour l'essai (50 μ L). Chaque expérience a été reproduite au moins trois fois. Pour chaque expérience, chaque mesure a également été répétée plusieurs fois. Les valeurs présentées représentent les moyennes de ces différents essais et les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards.

Les cinétiques de la stimulation hormonale ont été réalisées de la manière suivante : Après 12h d'induction de l'expression du récepteur par le galactose, la stimulation hormonale a été effectuée par l'ajout d'hormone (E2 et DES : 10⁻⁷M, 4-OHT : 10⁻⁵M, Ral : 10⁻⁴M ou ICI : 10⁻⁶M). A partir de cet instant, l'activité β -galactosidase est mesurée toutes les heures (jusqu'à 4h) puis toutes les deux heures (jusqu'à 12h) de la même manière que celle décrite précédemment.

Pour l'étude de l'impact des inhibiteurs de kinases, nous avons utilisé un mode opératoire qui diffère légèrement du précédent. En effet, au moment de l'induction de l'expression du récepteur aux œstrogènes par l'addition de 2% de galactose au milieu de culture, l'ajout des inhibiteurs de kinases (U0126, SB203580 et l'Aminopurvalanol A (Merck), 20 μ M) est réalisé simultanément. Après 12h d'incubation, la stimulation hormonale est effectuée par l'ajout de E2 (10⁻⁷M). Les activités cellulaires des ER sont mesurées 6h après cette stimulation hormonale comme ce qui a été décrit précédemment.

II.2.1.3 Analyse protéique

Extraction :

4 mL de cellules sont prélevées et centrifugées à 6000 tpm pendant 2 minutes à température ambiante. Les culots cellulaires sont repris dans 200 μ L de réactif de Pierce additionné d'inhibiteurs de protéases (Tableau 18) puis laissés sous agitation à température ambiante pendant 20 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 000g/15min/4°C). Le culot, séparé du surnageant est repris dans 120 μ L de réactif de Pierce additionné d'inhibiteurs de protéases.

Dosage protéique :

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Pour chaque série de dosage, une droite étalon est réalisée avec la sérumalbumine bovine.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes :

Les extraits protéiques ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Les gels de résolution (10% en polyacrylamide) et de concentration (4% en polyacrylamide) sont préparés à partir d'une solution stock d'acrylamide/bisacrylamide (Tableau 1). La migration s'effectue à 20mA constant par gel et 200V maximum pendant 2h à 3h. Les bandes protéiques sont révélées par une solution de Bleu de Coomassie (Tableau 1).

Western-Blot :

Afin de quantifier le niveau d'expression du ER chez *S. cerevisiae*, nous avons effectué deux types de Western-Blot : en détectant la GFP fusionnée au ER à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la GFP ou en détectant la partie C-terminale du hER α avec un anticorps appelé SP1.

Les transferts semi-secs de protéines sur nitrocellulose sont réalisés après séparation préalable de ces protéines sur un gel SDS-PAGE à 8% en polyacrylamide, à 100V pendant 2h en chambre froide à 4°C. Le transfert des protéines est vérifié par coloration de la membrane au rouge Ponceau (Tableau 18), permettant également de mettre en évidence les marqueurs de taille. Après décoloration par 2 lavages successifs dans du TBS (Tableau 18), la membrane est alors saturée dans une solution TBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de lait écrémé, pendant un nuit, à 4°C sous agitation. La membrane est ensuite rincée deux fois (5min) avec du TBST 0,05%. Une incubation de la membrane est effectuée en présence de l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre l'extrémité N-terminale de hER α (*Anti-Estrogen receptor clone SP1*, Lab Vision) ou contre la GFP (*Anti-GFP rabbit polyclonal serum*, Invitrogen) dilué 1000 fois dans du TBS contenant 2% de lait pendant 2h à température ambiante, sous agitation. L'incubation de l'anticorps secondaire (*Rabbit IgG HRP-linked whole Ab, Donkey*, GE Healthcare) est réalisée après cinq lavages successifs de 5 min avec

une solution de TBST 0,05%. Cet anticorps secondaire est dilué dans la même solution que le premier anticorps et l'incubation dure 2 h, à température ambiante, sous agitation. Après trois lavages de 10min au TBST 0,05% puis un au TBS, la révélation est effectuée grâce à l'utilisation du kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). Les membranes de nitrocellulose sont ensuite autoradiographiées (sur film *Classic Blue Autoradiography BX*, Midsci), pendant des temps variables (de 1 à 30 min).

II.2.1.4 Microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence

Principe :

Un faisceau lumineux monochromatique et cohérent, produit par un laser, est concentré en un point lumineux par un pinhole d'excitation (Figure 36). Il est ensuite réfléchi par un miroir dichroïque sur l'objectif qui le focalise en un petit volume au sein de l'échantillon. Le faisceau laser excite les sondes fluorescentes qui réémettent des photons. La lumière émise par les sondes fluorescentes est collectée par l'objectif et transmise vers le photomultiplicateur qui transforme le signal lumineux en signal électrique. Avant d'atteindre le photomultiplicateur, la lumière émise traverse un pinhole d'émission qui sélectionne les photons émis par les sondes fluorescentes localisées dans le plan focal. Seuls les photons émis par les sondes fluorescentes localisées dans le plan focal traversent le pinhole d'émission et contribuent au signal. Ces photons constituent un pixel ; le balayage laser permettra de former l'image.

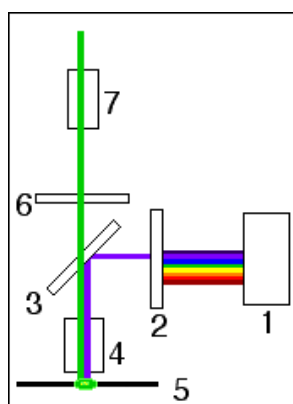


Figure 36 : Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage laser (CSLM).

(1) laser ; (2) pinhole d'excitation ; (3) miroir dichroïque ; (4) objectif ; (5) plan focal, échantillon ; (6) pinhole d'émission ; (7) photomultiplicateur.

Mode opératoire :

1mL de culture de levures est centrifugé (5000g / 30sec). Les cellules sont reprises dans 500µL de PBS. Le double-marquage de la chromatine et de la membrane plasmique est réalisé une incubation de 10 min à température ambiante de la suspension levurienne en présence de 50 µM de DRAQ-5 (Biostatus) puis de 10µM FPMM4-64 (Fluoroprobes). Le signal de la GFP est observé en excitant l'échantillon à 488nm et en collectant les photons émis par un filtre d'émission passe-bande 505-550nm. Le DRAQ5 et le FPMM4-64 sont excités respectivement à 633nm et 543 nm et les photons d'émission sont sélectionnés par un filtre 560LP ou 650LP.

II.2.2 Etude in vitro : Spectroscopie de fluorescence

II.2.2.1 Généralités

En absorbant un photon, un chromophore passe de son état électronique fondamental (S_0) à un état excité (S_n). Après s'être partiellement désexcité jusqu'au niveau S_1 celui-ci peut retourner à l'état fondamental en émettant un photon.

Le diagramme des niveaux énergétiques de l'absorption et de l'émission de la lumière est présenté en Figure 37. La désactivation des molécules excitées s'effectue suivant 3 grands processus (Jablonski, 1935) :

- par désactivation non-radiative, $S_n \rightarrow S_0$. L'énergie est alors dissipée par les chocs moléculaires.
- par désactivation radiative. Après désexcitation $S_n \rightarrow S_1$, la molécule en passant du premier niveau excité S_1 au niveau S_0 émet un photon, $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_F$; c'est le processus de fluorescence.
- par conversion inter-système : passage d'un état singulet S_j à un état triplet T_k . Le retour de T_1 à l'état fondamental S_0 peut s'effectuer avec émission d'un photon ; c'est le processus de phosphorescence.

Chaque fluorophore présente des caractéristiques d'émission particulières : longueur d'onde d'émission maximale, rendement quantique, temps de vie...

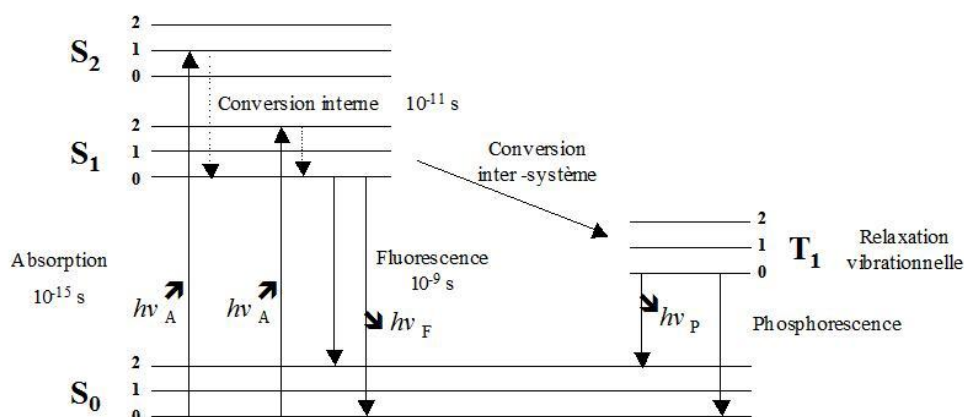
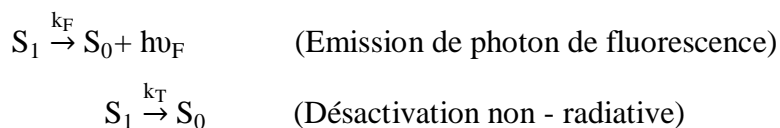


Figure 37 : Diagramme de Jablonski (Jablonski, 1935).

Les états électroniques fondamentaux excités sont désignés respectivement par S_0 , S_1 , et S_2 . Les niveaux énergétiques vibrationnels sont désignés par 0, 1 et 2.

Rendement quantique de fluorescence :

Prenons le cas simple où la molécule, après absorption d'un photon, passe de l'état S_0 à l'état S_1 . La désactivation du premier état singulet excité (S_1) se résume par :



Le rendement quantique de fluorescence Φ est défini par : $\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_T}$ où k représente les constantes cinétiques. Expérimentalement, Φ est déterminé par le rapport de n_F , nombre de photons émis, à n_A , nombre de photons absorbés : $\Phi = \frac{n_F}{n_A}$. L'intensité de fluorescence, I_F , étant proportionnelle au nombre total, n_F , de photons émis sur l'ensemble du spectre $\sum_i h\nu_i$, le rendement quantique de fluorescence est directement corrélé à l'intensité de fluorescence. Il caractérise l'efficacité du processus de fluorescence.

II.2.2.2 Sondes fluorescentes

Sonde fluorescente intrinsèque (résidu tryptophane) :

L'émission de fluorescence des protéines est principalement due aux résidus aromatiques. Aux longueurs d'onde d'excitation supérieures à 290nm, les résidus tryptophane sont sélectivement excités et le transfert d'énergie entre résidus tryptophane est très faible (Weber et Shinitzky, 1970).

Du fait de la répartition de charges partielles (Figure 38), négatives δ^- (cycle aromatique, hors du plan) et positives δ^+ (atome d'hydrogène, dans le plan), les résidus tryptophane sont sensibles à la charge de leur environnement.

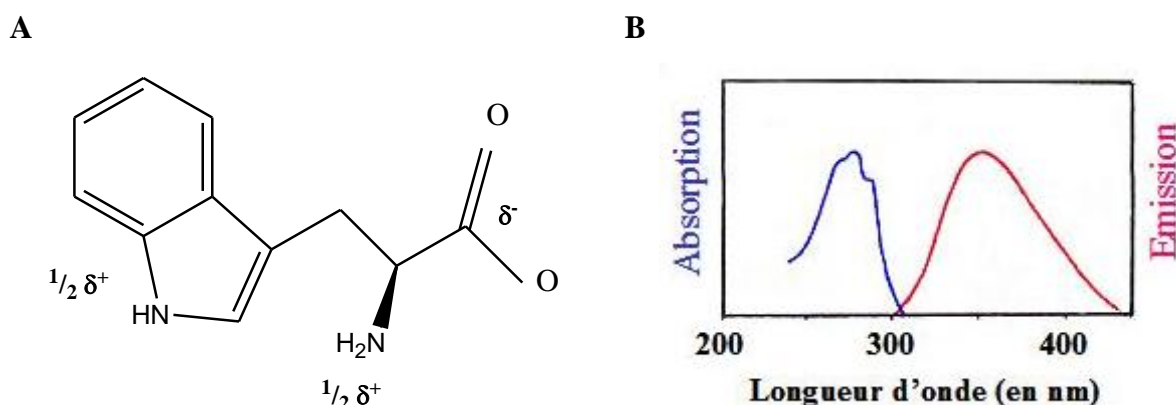


Figure 38 : Structure chimique et caractéristiques spectrales du tryptophane.

Ces spectres sont ceux obtenus dans le domaine visible, en solution aqueuse, à pH 7 et 25°C. (A) Structure chimique du tryptophane. (B) Absorption et émission du tryptophane en fonction de la longueur d'onde.

Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption du tryptophane, dans la région du proche UV, caractérisé par un épaulement à 271nm, un maximum à 279,5nm et un pic étroit à 288nm (Figure 38), est dû aux transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ du noyau indole. Des calculs de mécanique quantique ont montré une distribution inégale de la densité électronique sur les atomes du noyau indole induisant ainsi un grand moment dipolaire moléculaire et un changement prononcé de ce moment lors de la transition vers l'état excité. Ce phénomène est à l'origine des interactions dipôle-dipôle entre le chromophore et les molécules polaires du solvant. Les propriétés

physico-chimiques du solvant, dont la polarité, confèrent au noyau indole des caractéristiques d'absorption et d'émission particulières. Cette sensibilité aux conditions extérieures est plus prononcée pour le spectre d'émission de fluorescence.

Spectre d'émission de fluorescence

En solution aqueuse, à pH 7 et à 25°C, le spectre d'émission de fluorescence du tryptophane est large et peu structuré avec un maximum d'émission à 348nm (Figure 38). La position du maximum d'émission dépend de la polarité du solvant : son maximum d'émission est déplacé vers les courtes longueurs d'onde dans des solvants apolaires, alors qu'il est déplacé vers les grandes longueurs d'onde dans des solvants polaires.

Le déplacement de l'émission (déplacement de Stokes) du W, observé en fonction de la polarité du milieu, peut être dû à :

- la relaxation des molécules de solvant autour du fluorophore à l'état excité : réorientation des dipôles du solvant; ceci vient du fait que le moment dipolaire de l'indole à l'état excité est 2 à 3 fois plus intense qu'à l'état fondamental,
- la formation d'un exciplexe dû aux interactions entre le noyau indole et les molécules de solvant,
- la déprotonation du noyau indole.

Dans les protéines, les résidus tryptophane peuvent être dans des environnements différents : complètement enfouis dans la protéine, partiellement ou complètement exposés au solvant. Suivant leur environnement, les paramètres d'émission - longueur d'onde du maximum d'émission λ_{max}^F , largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda^F$, temps de vie τ et rendement quantique Φ de fluorescence - des résidus tryptophane diffèrent (Tableau 20).

Tableau 20 : Paramètres spectraux des résidus W situés dans des environnements protéiques distincts : classification de Burstein (Burstein *et al.*, 1973).

La classe I correspond à l'émission de résidus Trp complètement enfouis dans la protéine, la classe II aux résidus qui sont partiellement exposés au solvant, et la classe III à ceux qui sont complètement exposés au solvant.

Classe	I	II	III
λ_{\max}^F	330-332	340-342	350-353
$\Delta\lambda_{\max}^F$	48-49	54-56	59-61
Φ	0,1	0,3	0,2
τ	2,1	4,4	5,4

Résidus tryptophane au sein de hER α et hER β

hER α est pourvu de 5 résidus tryptophane alors que hER β en possède 7 (Figure 39). Les résidus W du hER α sont localisés de la façon suivante : 1 dans le DBD (W201), 1 dans la région charnière (W291) et 3 dans LBD (W360, W383, W393). Le positionnement des W du hER β est le suivant : 2 dans le domaine A/B (W80 et W107), 1 dans le DBD (W164) et 4 dans le LBD (W312, W335, W345 et W439). Les résidus W localisés dans le DBD et le LBD du hER α sont homologues à ceux présents dans ces domaines du hER β .

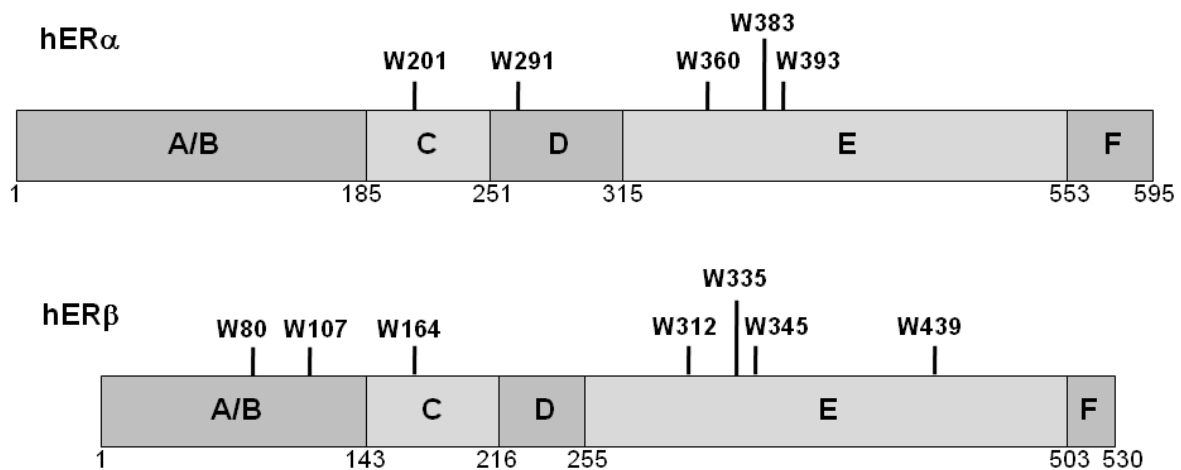


Figure 39 : Localisation des résidus tryptophane au sein de deux isotypes humains du récepteur aux œstrogènes.

Sonde fluorescente extrinsèque (la fluorescéine) :

Les molécules d'ADN ne présentant pas d'émission de fluorescence intrinsèque, un fluorophore extrinsèque, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), a donc été utilisé. Ce fluorophore, largement utilisé dans le marquage des protéines et des acides nucléiques, est attaché de façon covalente à la séquence oligonucléotidique *via* son groupement isothiocyanate.

La structure chimique et les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence de la fluorescéine dans l'eau et à pH 7 sont présentées dans la Figure 40. A pH 7, la fluorescéine en solution présente une longueur d'onde d'absorption maximale de 488nm ($\epsilon_{488\text{nm}} = 6.10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), une longueur d'onde d'émission maximale de 520nm, un rendement quantique de fluorescence de l'ordre de 1 et une durée de vie de l'état excité de l'ordre de 4 ns.

La fluorescéine attachée de façon covalente à un oligonucléotide présente le même spectre d'émission et la même durée de vie de l'état excité quel que soit l'état de complexation de l'oligonucléotide (Margeat *et al.*, 2003; Zargarian *et al.*, 2003). Cette durée de vie, de 4,1 ns, de la fluorescéine liée à un oligonucléotide de 35 pb, est due à 2 mouvements : un mouvement rapide de 500 ps pour 81% et la rotation globale de l'oligonucléotide pour 19%, dont le temps de corrélation de rotation est de 7 ns. Une fois complexé à la protéine, le temps de corrélation de l'oligonucléotide augmente ainsi que sa contribution dans la durée de vie de l'état excité (Margeat *et al.*, 2003).

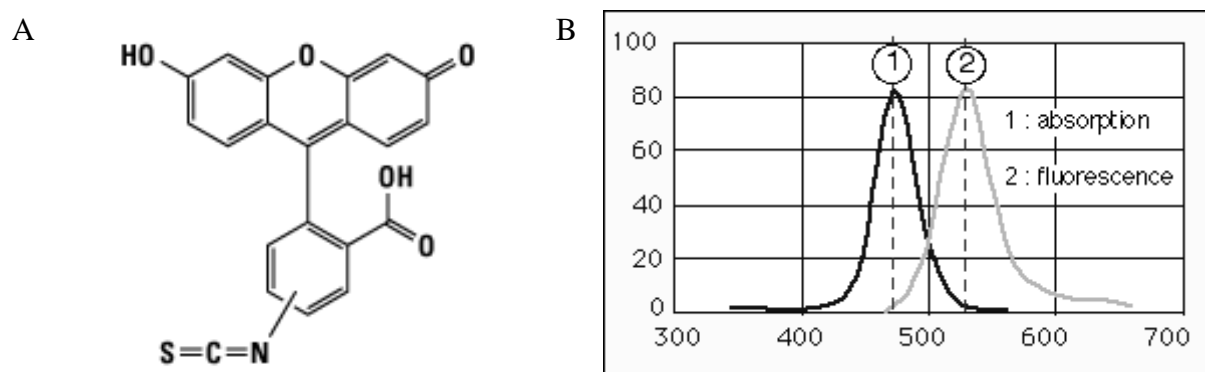


Figure 40 : Structure chimique et caractéristiques spectrales de la fluorescéine isothiocyanate (FITC).

Ces spectres sont ceux obtenus dans le domaine visible, en solution aqueuse, à pH 7 et 25°C. (A) Structure chimique de la FITC. (B) Absorption ou fluorescence relative de la FITC en fonction de la longueur d'onde (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/fluoverte.htm>).

II.2.2.3 Atténuation de fluorescence

Principe :

L'atténuation de fluorescence se réfère à tout processus tendant à diminuer l'intensité de fluorescence d'une substance donnée. Ceci peut provenir de plusieurs processus : relaxation, transfert d'énergie, extinction de fluorescence par collisions (quenching dynamique), et par extinction de fluorescence statique (quenching statique). Ces deux derniers processus requièrent le contact moléculaire entre le fluorophore et la molécule appelée inhibiteur. Pour nos expériences d'extinction de fluorescence des résidus tryptophane, l'inhibiteur utilisé est l'acrylamide. La collision entre le fluorophore et l'inhibiteur peut éteindre partiellement ou totalement l'émission de fluorescence I_{F_0} de l'ensemble des molécules excitées. Cette extinction de fluorescence peut être décrite par la relation de Stern-Volmer (Stern et Volmer, 1919), $\frac{I_{F_0}}{I_{F(Q)}}$ en fonction de [inhibiteur], ([Q]) :

$$\frac{I_{F_0}}{I_{F(Q)}} = 1 + K_{SV}[Q]$$

La constante de Stern-Volmer, K_{SV} , est obtenue graphiquement par la pente de la droite. Dans le cas où le processus d'extinction de fluorescence provient uniquement des chocs entre le fluorophore et l'inhibiteur suite à la diffusion brownienne de ce dernier, la relation de Stern-Volmer peut s'écrire de la façon suivante :

$$\frac{I_{F_0}}{I_{F(Q)}} = 1 + k_q \times \tau_0 [Q]$$

où k_q et τ_0 représentent respectivement la constante cinétique de collisions et la durée de vie de l'état excité du fluorophore en l'absence d'inhibiteur. La valeur de la constante k_q est reliée à la vitesse de diffusion de l'inhibiteur dans l'environnement du fluorophore.

Pour déterminer la fraction de fluorophores accessibles par les molécules d'inhibiteurs, dans le cas des protéines contenant plusieurs fluorophores identiques, la représentation de Lehrer (Lehrer, 1971) est utilisée :

$$\frac{I_{F_0}}{\Delta F} = \frac{1}{f_a \times K \times [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

où ΔF représente la variation d'intensité de fluorescence des fluorophores pour une concentration d'inhibiteur $[Q]$ donnée : $\Delta F = I_{F_0} - I_{F_{[Q]}}$ et f_a est la fraction maximale de fluorophores accessibles par l'inhibiteur. La représentation $\frac{I_{F_0}}{\Delta F} = \left(\frac{1}{[Q]} \right)$ est une droite dont l'ordonnée à l'origine donne la valeur de $\frac{1}{f_a}$.

Mode opératoire :

Ces expériences d'atténuation de fluorescence par l'acrylamide ont été menées avec une solution de hER α ou hER β à $5 \cdot 10^{-8} M$. Les spectres d'émission ont été obtenus en excitant l'échantillon protéique à 290nm et en collectant l'émission entre 300 et 430nm. Ces mesures ont été réalisées à 10°C dans le tampon d'étude contenant 80, 140 ou 200mM KCl en présence ou non de ligands (E2, DES, 4-OHT ou Ral à $10^{-7} M$) avec des concentrations variables d'acrylamide allant de 0 à 0,18M. La contribution du tampon est soustraite pour chaque mesure.

II.2.2.4 Temps de vie de fluorescence

Principe :

Dans le cas d'un fluorophore dont la désexcitation est illustrée ci-dessus, la constante de vitesse de désexcitation, k , est la somme des constantes cinétiques de chacun des processus : $k = k_F + k_T$. La durée de vie de l'état excité, τ , d'un fluorophore est donnée par la relation :

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_T} = \frac{1}{k}$$

La constante de vitesse du processus radiatif, k_F , est une caractéristique intrinsèque de la molécule; cette constante est liée à la durée de vie radiative du fluorophore par :

$$\tau_0 = \frac{1}{k_F}$$

Les durées de vie de la plupart des composés fluorescents rencontrés en biologie sont de l'ordre de quelques nanosecondes.

Mode opératoire :

Les mesures de temps de vie de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre FluoroMax3 (Horiba Jobin Yvon, Paris). Les acquisitions ont été menées, à température ambiante, sur des solutions protéiques à $4 \cdot 10^{-7} \text{M}$ en hER (α ou β) contenant ou non $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ de ligand (E2, DES, 4-OHT ou Ral) en présence ou non de 0,18M d'acrylamide. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 295 et 360nm. Les valeurs de temps de vie de fluorescence sont obtenues par modélisation du profil de déclin de fluorescence des résidus tryptophane avec une triple fonction exponentielle en utilisant le logiciel d'analyse DAS. La qualité de l'ajustement était évaluée par la valeur du χ^2 .

II.2.2.5 *Anisotropie de fluorescence*Principe :

L'anisotropie de fluorescence permet d'étudier des réactions d'association entre molécules en mesurant le degré de liberté (mouvement rotationnel) d'une molécule liée à un fluorophore. Elle est reliée au temps de corrélation de rotation du fluorophore (τ_c) fixé à la molécule. Le fluorophore, excité avec une lumière polarisée linéairement selon l'axe z, émet une lumière polarisée dans différentes directions. L'anisotropie mesurée est définie comme le rapport entre la différence d'intensité de fluorescence émise parallèlement ($I_{//}$) au vecteur électrique du faisceau laser d'excitation et celle émise perpendiculairement (I_{\perp}) et l'intensité totale de fluorescence (I_{tot}) (Figure 41).

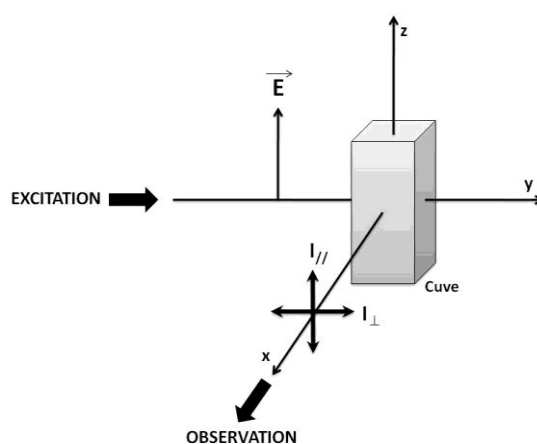


Figure 41 : Schéma du principe de mesure de l'anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie A s'exprime selon la relation ci-contre : $A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{\text{tot}}}$ avec $I_{\text{tot}} = I_{//} + 2 \times I_{\perp}$.

A peut également être exprimée en fonction du temps de corrélation de rotation du fluorophore (τ_c), de l'anisotropie de fluorescence limite du fluorophore (A_0) et du temps de vie de fluorescence du fluorophore (τ) selon la relation suivante : $A = \frac{A_0}{1 + \tau/\tau_c}$.

Mode opératoire :

L'anisotropie est mesurée à l'aide d'un montage en T, en excitant l'échantillon à 480nm et en collectant les intensités de fluorescence parallèles $I_{//}$ et perpendiculaire I_{\perp} à travers un filtre passe-bas OG515. La contribution du tampon est soustraite pour chaque mesure. Les courbes de titrage sont obtenues en maintenant constante la concentration en oligonucléotides fluorescéinés ($5 \cdot 10^{-10} \text{M}$) et en faisant varier la concentration protéique de $1 \cdot 10^{-11} \text{M}$ à $4 \cdot 10^{-8} \text{M}$ par des ajouts successifs d'une solution de hER α à $6,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ ou de hER β à $1,13 \cdot 10^{-6} \text{M}$ dans une solution tamponnée d'oligonucléotides. Le volume protéique ajouté est tel que la variation de la concentration totale d'oligonucléotide, en fin d'expérience, ne dépasse pas 10%.

II.2.2.6 Stabilité thermique

Les expériences de stabilité thermique ont été menées avec une solution d'hER α ou hER β à 10^{-7}M . Les spectres d'émission ont été obtenus en excitant l'échantillon protéique à 290nm et en collectant l'émission entre 300 et 430nm.

Ces mesures ont été réalisées pour des températures s'échelonnant de 5 à 55°C dans le tampon d'étude contenant 80, 140 ou 200mM KCl. La contribution du tampon est soustraite pour chaque mesure.

ETUDE COMPARATIVE DE RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES :
ASPECTS MOLECULAIRE ET CELLULAIRE DE LA REPONSE AUX ŒSTROGENES ET ANTI-
ŒSTROGENES IMPLIQUES DANS LES CAUSES ET THERAPIES DU CANCER DU SEIN

L'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices est sous le contrôle d'œstrogènes (E2). L'action de E2 est médiée par le récepteur aux œstrogènes (ER). La régulation des gènes cibles résulte de la fixation du ER sur une séquence d'ADN spécifique : Elément de Réponse aux Œstrogènes (ERE). Aujourd'hui, il est parfaitement reconnu que ER joue un rôle majeur dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Il est important de comprendre les mécanismes moléculaires qui modulent *in vivo* son activité. L'identification de la séquence ERE imparfaite (*rtvtgERE*) des gènes vitellogénine de la truite arc-en-ciel a permis de montrer que, comparé à l'ERE consensus, les ER présentent une affinité vis-à-vis de cette séquence, une activité cellulaire et une sensibilité à E2 plus faible. Cette « dégénérescence » de séquence permet donc un contrôle de la surproduction de vitellogénine. Une étude *in vitro* du comportement conformationnel, thermodynamique et dynamique des ER a mis en évidence que la modulation du réseau électrostatique au sein des ER doit jouer un rôle majeur dans leurs différences de fonctionnalité. Par des approches combinées de biophysique cellulaire et moléculaire, nous avons mené une étude *in vivo* afin de rechercher et de comparer l'impact de la liaison au ligand sur l'activité cellulaire de deux ER : l'isoforme α du récepteur aux œstrogènes humain (hER α) et l'isoforme courte du récepteur de la truite arc-en-ciel (rtER_S). La reconstitution du mécanisme transcriptionnel des ER chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nous a permis de démontrer que hER α est un facteur d'activation de la transcription plus puissant que rtER_S et qu'il est également plus sensible aux œstrogènes que rtER_S. Nous avons également montré que la présence de ligands induit une relocalisation des ER au sein de *foci*. Une étude cinétique de l'activation transcriptionnelle (quelques heures) et de la relocalisation subcellulaire (quelques minutes) des ER en présence d'hormone nous pousse à distinguer ces deux aspects. Nous suggérons qu'un niveau élevé de phosphorylation de ER par les kinases activées en présence de ligands, augmente son caractère anionique et ceci aurait pour effet soit d'empêcher la fixation du ER à l'ADN soit de l'en dissocier. De ce fait, ER pourrait être recruté par des complexes existants soit dans le noyau soit dans le cytoplasme et formé ces *foci*.

Mots clés : Récepteurs aux œstrogènes, régulation de la transcription, distribution sub-cellulaire, interactions protéine-ligands et protéines-ADN.